

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mikrobiologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Daniel Pinkas

Vliv promotorové sekvence na využití NAD^+ jako substrátu pro iniciaci transkripce
RNA polymerázou

Effect of promoter sequence on utilization of NAD^+ as a substrate for transcription
initiation by RNA polymerase

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Libor Krásný, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8. 8. 2018

.....

Děkuji svému školiteli Mgr. Liboru Krásnému PhD. za vedení a rady při vypracování této diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Natálii Panové PhD. a Mgr. Olatz Ruiz-Larrabeiti PhD. za spolupráci při výzkumu vedoucím k výsledkům v této práci.

Abstrakt

Čepička na 5' konci RNA byla dlouhou dobu považována za výsadu eukaryotních organismů v podobě 7-metylguanosenové čepičky na konci mRNA. To se však změnilo v poměrně nedávné době, kdy byla v bakterii *E. coli* pomocí metod kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie objevena nová molekula asociovaná s RNA. Touto molekulou se ukázal být nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺), připojený na 5' konec některých malých regulačních RNA (sRNA). Pozdější pokusy ukázaly, že je NAD⁺ na 5' konec RNA přidáno RNA polymerázou *ab initio*, tedy že NAD⁺ může sloužit jako substrát pro RNA polymerázu při iniciaci transkripce. Výběr substrátu pro iniciaci transkripce určuje do značné míry promotorová sekvence, přičemž zásadním požadavkem je přítomnost adeninu na pozici +1 (transkripční počátek) kódujícího vlákna DNA. Tato práce se věnuje právě sekvenčním požadavkům na promotor pro iniciaci transkripce pomocí NAD⁺. Ty jsou zde zkoumány ve třech fázích transkripce *in vitro* s holoenzymem RNA polymerázy z bakterie *Escherichia coli*. Jako templát pro transkripci jsou použity různě modifikované promotory RNA1, *Pveg*, *lac* UV5, *rrnB* P1 a jejich chiméry. Také je zde porovnávána RNA polymeráza z bakterií *E. coli* a *B. subtilis* z hlediska výběru substrátu pro iniciaci transkripce. Dále je zde popsána izolace proteinu NudC, enzymu štěpícího NAD⁺ na nikotinamid mononukleotid (NMN) a adenosin monofosfát (AMP). Enzym NudC bude využit pro další pokusy týkající se NAD⁺ čepičky.

Klíčová slova: NAD⁺, RNA, RNA polymeráza, 5' čepička, promotor, iniciace transkripce, NudC

Abstract

For a long time, 5' cap has been thought to be privilege only for eukaryotic organisms in form of 7-methylguanosine cap at the end of mRNA. This was changed only a few years ago. By using methods liquid chromatography and mass spectrometry a new molecule associated with RNA of *Escherichia coli* has been found. This molecule turned out to be nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) attached to 5' end of some small regulatory RNAs (sRNA). Later it has been shown, that RNA polymerase can attach NAD⁺ at 5' of RNA *ab initio*, meaning that RNA polymerase can utilize NAD⁺ as a substrate for transcription initiation. To some extent substrate for transcription initiation is chosen based on promoter sequence. Crucial requirement is presence of adenine at +1 position of DNA coding strand. This thesis focuses on promoter sequence requirements for transcription initiation with NAD⁺. As a template for transcription four promoters with different modifications and their chimeras are used: RNA1, *Pveg*, *lac* UV5 and *rrnB* P1. Also, I tried to compare RNA polymerase from *E. coli* and *B. subtilis* in terms of transcription initiation substrate usage. Lastly, I describe here isolation of NudC, enzyme that cleaves NAD⁺ to nicotinamide mononucleotide (NMN) and adenosine monophosphate (AMP). NudC will be used for upcoming experiments involving NAD⁺ cap.

Key words: NAD⁺, RNA, RNA polymerase, 5' cap, promoter, transcription initiation, NudC

Obsah

| | |
|--|----|
| Abstrakt | 3 |
| Abstract..... | 4 |
| Seznam zkratek..... | 8 |
| 1. Úvod | 9 |
| 2. Literární přehled | 10 |
| 2.1 Syntéza RNA..... | 10 |
| 2.1.1 Bakteriální RNA Polymeráza | 10 |
| 2.1.2 Promotor | 12 |
| Promotor RNA1 | 13 |
| Promotor lacUV5 | 14 |
| Promotor Pveg..... | 14 |
| Promotory rrnB P1..... | 14 |
| 2.1.3 Iniciace transkripce..... | 14 |
| 2.2 NAD ⁺ čepička na 5' konci mRNA..... | 17 |
| 2.3 NudC | 21 |
| 3. Cíle práce | 23 |
| 4. Materiál a metody | 24 |
| 4.1 Přístroje | 24 |
| 4.1.1 Centrifugy | 24 |
| 4.1.2 Třepačky a termostaty..... | 25 |
| 4.1.3 Elektroforézy a zdroje napětí | 26 |
| 4.1.4 Ostatní přístroje..... | 26 |
| 4.2 Chemikálie a enzymy | 28 |
| 4.2.1 Chemikálie | 28 |
| 4.2.2 Enzymy a pufry | 30 |
| 4.3 Vektory | 32 |
| 4.3.1 Plazmid p770 | 32 |
| 4.3.2 Plazmid pET-28a(+) | 32 |
| 4.4 Bakteriální kmeny | 34 |
| 4.4.1 <i>E. coli</i> | 34 |
| 4.4.2 <i>B. subtilis</i> | 34 |
| 4.5 Elektroforéza | 34 |

| | |
|--|----|
| 4.5.1 Horizontální agarózová elektroforéza | 34 |
| 4.5.2 Vertikální polyakrylamidová elektroforéza | 35 |
| 4.5.3 SDS-PAGE | 36 |
| 4.6 Klonování | 37 |
| 4.6.1 Návrh sekvence DNA | 37 |
| 4.6.2 Annealing | 38 |
| 4.6.3 Restrikční štěpení | 38 |
| 4.6.4 Izolace plazmidu z gelu | 38 |
| 4.6.5 Ligace | 40 |
| 4.6.6 Transformace | 40 |
| 4.6.7 Sekvence a pomnožení transformovaných buněk | 41 |
| 4.6.8 Izolace plazmidové DNA-Midiprep | 42 |
| 4.6.9 Fenol-chloroformová extrakce | 43 |
| 4.7 Izolace a práce s proteiny | 43 |
| 4.7.1 Izolace RNA polymerázy <i>B. subtilis</i> | 44 |
| 4.7.2 Izolace enzymu NudC | 45 |
| 4.7.3 Dialýza | 46 |
| 4.7.4 Měření koncentrace proteinů | 47 |
| 4.7.5 Rekonstituce RNA polymerázy | 47 |
| 4.7.6 Gelová chromatografie | 47 |
| 4.8 Transkripční experimenty <i>in vitro</i> | 48 |
| 4.8.1 Protokol transkripčních experimentů <i>in vitro</i> | 48 |
| 4.8.2 Vyhodnocení transkripčních experimentů <i>in vitro</i> | 49 |
| 5 Výsledky | 51 |
| 5.1 Příprava templátů pro transkripci | 51 |
| 5.1.1 Transformace | 53 |
| 5.1.2 Izolace plazmidů | 53 |
| 5.2 Izolace proteinů | 55 |
| 5.2.1 Výsledek izolace RNA polymerázy <i>B. subtilis</i> | 55 |
| 5.2.2 Výsledek izolace enzymu NudC | 56 |
| 5.2.3 Ověření aktivity enzymu NudC | 58 |
| 5.3 Transkripční experimenty | 60 |

| | |
|--|----|
| 5.3.1 1. fáze transkripčních experimentů <i>in vitro</i> | 60 |
| 5.3.2 2. fáze transkripčních experimentů <i>in vitro</i> | 62 |
| 5.3.3 3. fáze transkripčních experimentů <i>in vitro</i> | 64 |
| 5.3.4 Transkripce <i>in vitro</i> s polymerázou z <i>B. subtilis</i> | 67 |
| 6. Diskuze..... | 68 |
| 6.1 Příprava templátů pro transkripci | 68 |
| 6.2 Enzym NudC..... | 68 |
| 6.3 Transkripční experimenty | 70 |
| 6.3.1 1. fáze transkripčních experimentů | 70 |
| 6.3.2 2. fáze transkripčních experimentů | 71 |
| 6.3.3 3. fáze transkripčních experimentů | 73 |
| 6.3.4 Budoucí experimenty..... | 75 |
| 6.3.5 Transkripce s polymerázou <i>B. subtilis</i> | 76 |
| 7. Souhrn..... | 77 |
| 8. Seznam použité literatury..... | 78 |

Seznam zkratek

AMP – adenosin monofosfát

CTD – C-koncová doména

FAD – flavin adenin dinukleotid

HPLC – vysokotlaká kapalinová chromatografie (high pressure liquid chromatography)

iNTP – iniciační nukleosid trifosfát

MCS – multiklonovací místo (multiple cloning site)

MS – hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)

NAD⁺ – nikotinamid adenin dinukleotid

NMN – nikotinamid mononukleotid

NTD – N-koncová doména

NTP – nukleosid trifosfát

PAA – polyakrylamid

RNAP – RNA polymeráza

RU – relativní účinnost

1. Úvod

Mediátorová ribonukleová kyselina (mRNA) je nezbytným meziproduktem při syntéze proteinů podle informace uložené v DNA. Jakékoliv alterace mRNA mohou hrát důležitou roli při regulaci genové exprese, proto je dobré znát původ a význam těchto modifikací. Různé modifikace mRNA byly historicky výsadou pouze eukaryotických organismů. To platilo až do nedávné doby, kdy před necelými deseti lety bylo díky kombinaci metod kapalinové chromatografie (HPLC) a hmotnostní spektrometrie (MS) objeveno několik nestandardních bází (tedy jiných, než je adenin, guanin, cytosin a uracil) také v RNA prokaryot (Chen et al., 2009).

Jednou z takto objevených molekul je také nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+), který se vyskytuje na 5' konci některých RNA bakterií (Cahová et al., 2015) i eukaryot (Jiao et al., 2017; Walters et al., 2017), kde tvoří „čepičku“ podobnou 7-metylguanosinové čepičce na konci mRNA eukaryot. Převládajícím názorem v tuto chvíli je, že se jedná o kotranskripční modifikaci (výběr NAD^+ jakožto iniciačního substrátu pro transkripci) způsobenou RNA polymerázou (Bird et al., 2016), přestože některé publikace hovoří o posttranskripčních úpravách (Chen et al., 2009; Luciano a Belasco 2015).

V této diplomové práci nejprve popíši izolaci proteinu NudC, enzymu potřebného pro následné *in vivo* studium NAD^+ čepičky, shrnu své výsledky týkající se způsobu výběru substrátu RNA polymerázou při iniciaci transkripce (NAD^+ oproti kanonickým nukleotidům) a pokusím se porovnat RNA polymerázu z *E. coli* a *B. subtilis* z hlediska výběru NAD^+ jako substrátu pro iniciaci transkripce.

2. Literární přehled

2.1 Syntéza RNA

Syntéza RNA je (nejen) v bakteriích zajištěna pomocí DNA dependentní RNA polymerázy procesem zvaným transkripce. Tento proces se skládá z iniciace (2.1.3), kdy RNA polymeráza (2.1.1) nasedá na promotor (2.1.2) a začíná syntetizovat RNA, elongace a terminace (elongace a terminace nejsou z hlediska mé práce tolik důležité, proto se jim zde nevěnuji).

2.1.1 Bakteriální RNA Polymeráza

Bakteriální DNA dependentní RNA polymeráza (RNAP) byla poprvé objevena a izolována mezi lety 1955-1961 (Hurwitz 2005). Jedná se o proteinový komplex složený většinou z 5 základních podjednotek: dvě α , β , β' a ω (obr. 1). Tyto podjednotky tvoří dohromady jádro RNA polymerázy o souhrnné hmotnosti 370 kDa (Burgess 1969). Na jádro RNA polymerázy následně nasedá podjednotka σ (faktor sigma), která společně s jádrem tvoří holoenzym RNAP.

Formování RNA polymerázy začíná sestavením homodimeru ze dvou α podjednotek. Ty jsou kódovány genem *rpoA* a skládají se ze dvou domén propojených linkerem. N-terminální doména je zodpovědná za dimerizaci monomerů a taktéž za připojení dalších podjednotek (β a β') ke komplexu (Hayward et al., 1991). C-terminální doména α podjednotek (α CTD) interaguje s některými regulačními proteiny a také s UP elementy promotoru (viz 2.1.2), čímž může mnohonásobně zvyšovat aktivitu RNA polymerázy (Ross et al., 1993).

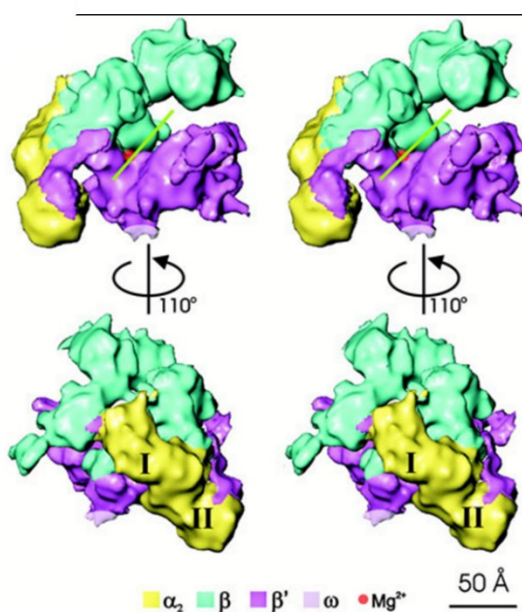
Jak již bylo zmíněno, podjednotky β a β' (kódovány geny *rpoB* a *rpoC*) se váží na N-terminální domény podjednotek α ve zformovaném homodimeru, a tvoří spolu strukturu „krabího klepeta“ (Murakami 2015). Tato struktura je katalytickým centrem RNA polymerázy a vytváří 32 Å široký kanál s vazebným místem pro DNA, duplex RNA/DNA, RNA a iont Mg^{2+} , jenž je nezbytný pro aktivitu RNA polymerázy (Zhang et al., 1999), (Finn et al., 2000).

Podjednotka ω je oproti ostatním částem RNAP poměrně malý protein (91 aminokyselin, 10 105Da), kódovaný genem *rpoZ* (Gentry a Burgess 1993). Tato podjednotka interaguje pouze s β' , jejíž C-terminální doménu zcela obaluje (Gentry a Burgess 1993; Zhang et al., 1999), napomáhá jejímu správnému sbalení a usnadňuje vazbu na komplex $\alpha\alpha\beta$ (Ghosh et al., 2001).

Podjednotka ω sice přispívá ke správnému zformování jádra RNAP, její přítomnost však není bezpodmínečně nutná (Gentry et al., 1991; Mukherjee a Chatterji 1997).

Kromě jádra RNA je k fungování RNA polymerázy nutná ještě podjednotka σ , jenž je zodpovědná za rozpoznání a nasednutí holoenzymu na DNA. Existuje mnoho různých druhů podjednotek σ a různé druhy bakterií jich mohou mít různý počet: od jediné až po více než 100 (Paget 2015). Jednotlivé typy faktorů sigma rozpoznávají různé sekvence na DNA a jsou proto zodpovědné za odlišnou genovou expresi. Zastoupení jednotlivých faktorů sigma, a tedy i rozdílná genová exprese je závislá na podmínkách, ve kterých se buňka nachází. Například v bakterii *Escherichia coli* je v exponenciální fázi růstu zodpovědný za většinu transkriptů „house keeping“ faktor sigma, σ^{70} (Feklistov et al., 2014), naopak při stresových podmínkách získávají větší podíl na transkripci jiné faktory sigma (například σ^{34} při teplotním šoku, Grossman et al., 1984). Na rozdíl od jádra RNA polymerázy, které je napříč celou doménou bakterií velice konzervováno, mohou být různé druhy podjednotek σ sekvenčně velice odlišné. V současné době rozeznáváme dvě naprosto rozdílné rodiny faktorů sigma, σ^{70} a σ^{54} , které jsou i přes svou nepříbuznost hojně zastoupené v celé bakteriální říši ((Merrick 1993; Zhang a Buck 2015). Faktory sigma z rodiny σ^{54} však v této práci nepoužívám, proto se jim zde blíže nevěnuji a všechny příklady interakcí jsou vztažené na rodinu σ^{70} .

Některé grampozitivní bakterie mají navíc ještě podjednotku δ (Pero et al., 1975), která pomáhá zvyšovat afinitu RNA polymerázy k iniciačnímu NTP, čímž zlepšuje konkurenceschopnost v nepříznivých podmínkách (Rabatinová et al., 2013). Relativně



nedávno byla v grampozitivních bakteriích identifikována ještě podjednotka ϵ , o jejíž funkci se zatím příliš mnoho neví. Spekuluje se však, že by mohla mít roli v ochraně RNA polymerázy před některými proteiny bakteriofágů (Keller et al., 2014; Weiss a Shaw 2015).

Obr. 1: Struktura RNA polymerázy. V horní polovině obrázku pohled na strukturu „krabiho klepeta“, která tvoří kanál pro DNA (orientace znázorněna zelenou čarou) a vazebné místo pro Mg^{2+} (znázorněn červenou tečkou). Ve spodní polovině obrázku je RNA polymeráza otočena o 110° (upraveno podle Finn et al., 2000).

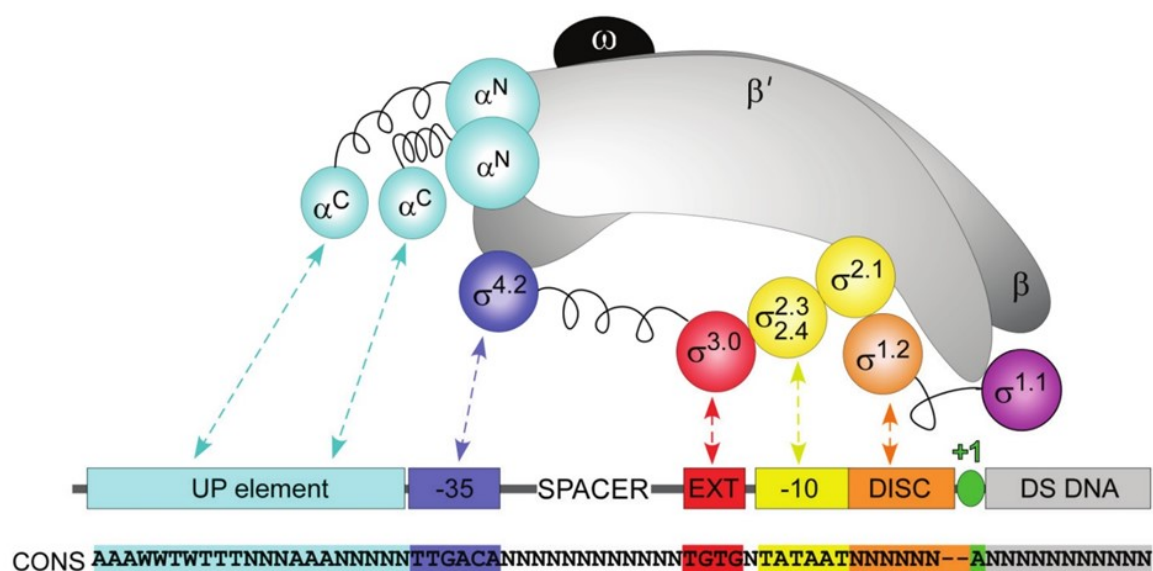
2.1.2 Promotor

Promotor je oblast na DNA rozpoznávaná faktorem sigma holoenzymu RNA polymerázy (obr. 2). Sekvence promotoru mohou být různé a různé faktory sigma k nim mají rozdílnou afinitu, což je důležitý prvek regulace genové exprese. Promotor se skládá z několika základních částí, se kterými interagují různé domény faktoru sigma a z takzvaného UP elementu, se kterým interagují C-terminální domény podjednotek α RNA polymerázy. Dále se zde věnuji jednotlivým částem promotoru rozpoznávaným „housekeeping“ faktorem sigma z *E. coli*, σ^{70} .

Základem každého promotoru je takzvaný TATA box (Pribnowův box) v oblasti -10 promotoru (číslování od 5' k 3' konci kódujícího vlákna, přičemž +1 je transkripční počátek), jehož AT bohatá sekvence (konsensus sekvence $^{-12}\text{TATAAT}^{-7}$) je po kontaktu s RNA polymerázou (s doménou 2 podjednotky σ) při iniciaci transkripce jako první rozpletena (Ruff et al., 2015). Dalším nezbytným prvkem každého promotoru je oblast -35 (konsensus sekvence $^{-35}\text{TTGACA}^{-30}$, Hawley a McClure 1983), která interaguje s doménou 4 podjednotky σ , jejíž strukturní motiv „helix-turn-helix“ ohýbá DNA v této oblasti asi o 36° (Zuo a Steitz 2015). Oblasti promotoru -35 a -10 jsou odděleny oblastí bez jednoznačně určené konsensus sekvence, takzvaným mezerníkem. Tato oblast má však danou velikost mezi 16 a 19 nukleotidy, s konsensus velikostí 17 nukleotidů (Shimada et al., 2014). Velikost mezerníku je dána vzdáleností mezi doménami 4 a 2 faktoru sigma (Murakami et al., 2002). Jakákoliv odchylka od toho konsensu výrazně snižuje účinnost transkripce (Aoyama et al., 1983).

Dalšími prvky promotoru, které nejsou nezbytné pro rozeznání promotoru RNA polymerázou, ale hrají roli při iniciaci transkripce (viz 2.1.3), jsou prodloužená oblast -10 a diskriminátor. Prodloužená oblast -10 má sekvenci $^{-15}\text{TGN}^{-13}$, která interaguje s doménou 3 podjednotky σ (Barne et al., 1997), čímž pravděpodobně prodlužuje dobu života otevřeného komplexu DNA a RNA polymerázy (Haugen et al., 2006). Absence prodloužené oblasti -10 snižuje aktivitu RNA polymerázy, zejména pak u promotorů se slabší -35 oblastí (Keilty a Rosenberg 1987). Diskriminátorem se původně nazývala jakákoliv GC bohatá oblast. Pro potřeby této práce je jako diskriminátor označována oblast mezi -10 oblastí a +1 iniciačním nukleotidem, která bývá dlouhá 6-8 nukleotidů (Shimada et al., 2014). Diskriminátor interaguje s doménou 1 podjednotky σ (Haugen et al., 2008) a jeho délka ovlivňuje stabilitu otevřeného komplexu DNA a RNA polymerázy (Liu a Turnbough 1994; Ruff et al., 2015).

UP element se nachází přibližně v oblasti -40 až -60 promotoru. Jedná se o AT bohatou oblast (Rosenberg a Court 1979; Estrem et al., 1998) skládající se až ze dvou částí, distální a proximální (každá část interaguje s jednou α CTD, Estrem et al., 1999) jejíž (ne)přítomnost může ovlivnit míru transkripce z daného promotoru až 330x (Rao et al., 1994).



Obr. 2: Schéma interakce jednotlivých částí RNA polymerázy s promotorem. Doména 1 podjednotky σ interaguje s diskriminátorem (oranžově), doména 2 podjednotky σ se váže na -10 oblast na promotoru (žlutě), doména 3 podjednotky σ interaguje s -10 prodlouženou oblastí (červeně) a doména 4 podjednotky σ se váže na -35 oblast promotoru (fialově). C-terminální domény obou podjednotek α interagují s proximální, resp. distální částí UP elementu (tyrkysově). Ve spodní části obrázku je konsensus sekvence pro promotory bakterie *Escherichia coli* (upraveno podle Ruff et al., 2015).

Následuje stručné seznámení se čtyřmi promotory, které jsou důležité pro tuto práci. Všechny jsou rozpoznávané faktorem sigma σ^{70} a k syntéze RNA z nich používám holoenzym (se σ^{70}) RNA polymerázy z bakterie *E. coli*.

Promotor RNA1

Na promotoru RNA1 (obr. 3) začíná transkripce RNA1, což je malá nekódující RNA regulující replikaci plazmidu Cole1 z bakterie *Escherichia coli*. RNA1 se váže na replikaci iniciující primer, čímž zabraňuje počátku replikace a reguluje tak počet plazmidů v buňce (Tamm a Polisky 1985). RNA1 byla jedna z prvních RNA, u které byla objevena NAD^+ čepička, a to v poměrně vysoké míře (Cahová et al., 2015). Od té chvíle jsou RNA1 a promotor pro ni využívány (nejen) naší laboratoří jako model připojování NAD^+ k RNA.

Promotor *lacUV5*

LacUV5 promotor (obr. 3) je mutantní forma promotoru *lac*. Jedná se o velice silný promotor, který na kterém RNA polymeráza nepotřebuje k iniciaci transkripce žádné další pomocné proteiny (Siebenlist et al., 1980). *LacUV5* je velice dobře prozkoumaným a často využívaným promotorem, proto jsme se rozhodli ho použít i v našich experimentech.

Promotor *Pveg*

Pveg je konstitutivní promotor (obr. 3) z organismu *Bacillus subtilis*, transkribovaný RNA polymerázou s navázanou podjednotkou σ^A (hlavní sigma faktor v *B. subtilis*, Jarmer et al., 2001). Tento promotor je rozpoznáván i polymerázou z *E. coli* s navázaným σ^{70} , takže je ideálním pro porovnání promotorů z *E. coli* a *B. subtilis*.

Promotory *rrnB P1*

rrnB P1 (obr. 3) jsou v obou modelových organismech *E. coli* i *B. subtilis* promotory pro rRNA (mají shodný název, ale odlišnou sekvenci). Jedná se o takzvané [iNTP] senzitivní promotory, jejichž síla je závislá na koncentraci iniciačního nukleotidu (Gaal et al., 1997; Sojka et al., 2011). Tato vlastnost je odlišuje od ostatních v této práci používaných promotorů, a proto byly vybrány pro srovnání a charakterizaci ohledně výběru NAD^+ jako substrátu pro iniciaci transkripce.

| | -35 | -10 | +1 |
|---------------------|--------------------------------|-------------------|----------------------|
| RNA1 | TTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCT | TACACTAGAAAGG | ACAGTAT |
| Pveg | TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGT | TACAATAAAATGT | AGTGAGG |
| LacUV5 | GGCTTTTACACTTTTATGCTTCCGGCTCGT | TATAATGTGTGG | ATATTGT |
| Eco rrnB P1 | CTCTTGTCAGGCCGGAATAACTCCC | TATAATGCGCCACC | ACTGACA |
| Bsub rrnB P1 | CTATTGCAA | TAAATAAATACAGGTGT | TATATTATTCACCACCGCGC |

Obr. 3: Sekvence vybraných promotorů. Obrázek znázorňuje sekvence promotorů používaných v této práci: RNA1, Pveg, LacUV5 a rrnB P1 *E. coli* i *B. subtilis*. Tučně jsou zvýrazněny oblasti -35 a -10, červeně pak iniciační nukleotid +1.

2.1.3 Inicie transkripce

Iniace transkripce je několika krokový proces, který může být regulován na mnoha úrovních. Iniace transkripce začíná nasednutím holoenzymu RNA polymerázy na promotorovou sekvenci DNA a formací takzvaného uzavřeného komplexu. RNA polymeráza následně rozvine část DNA tak, že vznikne asi 12-14 nukleotidů velká (v závislosti na velikosti

diskriminátoru) bublina mezi druhým nukleotidem v oblasti -10 (TATAAT) a +2 nukleotidem hned za transkripčním počátkem (Bae et al., 2015), takže vzniká takzvaný otevřený komplex. Otevřený komplex vzniká v případě faktorů sigma z rodiny σ^{70} spontánně, zatímco faktory sigma z rodiny σ^{54} vyžadují pomocné ATP hydrolyzující proteiny (Popham et al., 1989; Buck et al., 2000).

Následujícím krokem je připojení komplementárního iniciačního nukleotidu +1 (iNTP) a následujícího nukleotidu +2 na templátové vlákno DNA za vzniku fosfodiesterové vazby mezi nasedlými nukleotidy +1 a +2. V tomto kroku jsou důležité ionty Mg^{2+} , jeden v katalytickém centru RNA polymerázy a další na přichozích NTPs (Nudler 2009). Rychlost tohoto kroku je závislá na koncentraci iniciačního NTP a je velmi důležitá u takzvaných iNTP-senzitivních promotorů, jejichž otevřený komplex s RNA polymerázou je velmi nestabilní (Murray et al., 2003; Krásný a Gourse 2004).

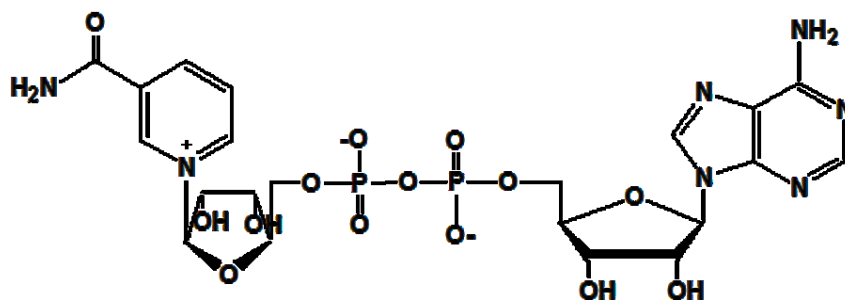
Substrátem pro iniciaci transkripce však nemusí být pouze NTP. RNA polymeráza může transkripci iniciovat pomocí takzvaných nanoRNA (Niyogi a Stevens 1964; Goldman et al., 2011), což jsou oligonukleotidy dlouhé 2-5 bází (Mechold et al., 2007). Ty mohou vznikat buď degradací RNA, nebo jako produkt abortivní iniciace transkripce (Nickels a Dove 2011). Bylo dokázáno, že iniciace transkripce pomocí nanoRNA může ovlivnit výběr transkripčního počátku a genovou expresi v závislosti na růstových podmínkách (Vvedenskaya et al., 2012). Dalšími substráty, které dokáže RNA polymeráza využít pro iniciaci transkripce, jsou NAD^+ , NADH, FAD a koenzym A (Bird et al., 2016) a také prekurzory syntézy buněčné stěny, jako je UDP-glukóza (Julius a Yuzenkova 2017). V případě těchto nekanonických iniciačních substrátů však zatím nebyl podán jednoznačný důkaz, že je RNA polymeráza využívá *in vivo* (využití bylo demonstrováno pouze *in vitro*), nicméně tato skutečnost se předpokládá (Barvík et al., 2017).

Po vytvoření fosfodiesterové vazby mezi prvními dvěma nukleotidy je otevřený komplex stabilizován a RNA polymeráza vtáhne templátové vlákno DNA dovnitř komplexu (který je stále pevně uchycen na promotoru), čímž zvětší transkripční bublinu a posune následující nukleotid na templátovém vlákně do aktivního místa polymerázy, takže se může připojit následující nukleotid (Revyakin et al., 2006; Winkelman et al., 2015). Po syntéze 4-5 nukleotidů dlouhého vlákna začne nově vznikající RNA narážet do domény 3 podjednotky σ , která blokuje výstupní kanál pro RNA (Basu et al., 2014; Zuo a Steitz 2015). V tomto okamžiku může docházet k takzvané abortivní iniciaci, kdy se nově vznikající RNA uvolní z komplexu RNA

polymerázy a DNA, a proces iniciace transkripce od nasednutí iNTP musí začít znovu (Carpousis a Gralla 1980). Po syntéze úseku dlouhého 8-12 nukleotidů dochází vlivem interakce nově vzniklé RNA a podjednotky σ k uvolnění RNA polymerázy z promotoru a disociace podjednotky σ od jádra RNA polymerázy. Délka vlákna RNA potřebná k uvolnění RNA polymerázy z promotoru a četnost abortivní iniciace jsou závislé na velikosti diskriminátoru (a tedy stabilitě otevřeného komplexu, Henderson et al., 2017) a sekvenci vznikajícího vlákna RNA (Heyduk a Heyduk 2018). Uvolnění RNA polymerázy z promotorové sekvence je považováno za konec iniciace a počátek elongace transkripce.

2.2 NAD⁺ čepička na 5' konci mRNA

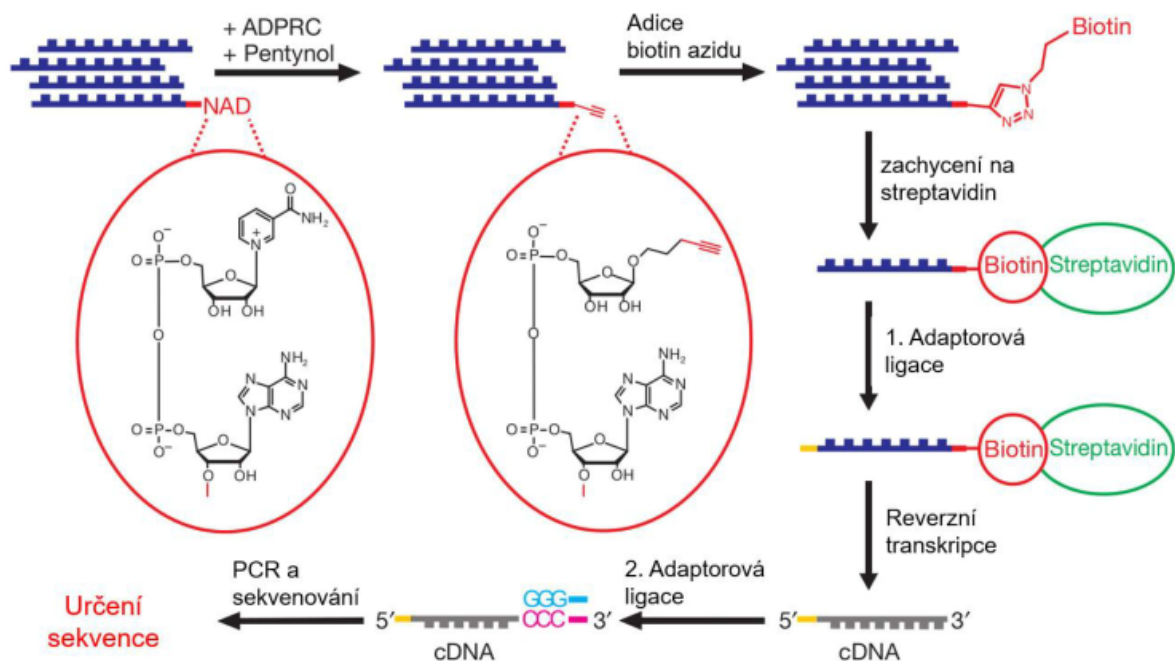
Nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺, [obr. 4](#)), případně jeho redukována forma NADH, je koenzymem v mnoha oxidačně-redukčních procesech jak v bakteriích, tak v eukaryotních buňkách. Může být syntetizován *de novo* z tryptofanu, nebo přímo z nikotinamidu, jehož zdrojem bývá nejčastěji degradace právě NAD⁺ (Panozzo et al., 2002). Nejvýraznější role NAD⁺ je jistě v energetickém metabolismu, kde má funkci akceptoru elektronů (oxidační činidlo), kromě toho se však účastní také opravy DNA, kde funguje jako kofaktor DNA ligáz (Wilkinson et al., 2001). Redukovaná forma NAD⁺ (NADH) pak bývá nejčastěji reoxidována v respiračním řetězci za tvorby protonového gradientu (Ingledew a Poole 1984). To udržuje fyziologický poměr NAD⁺:NADH, který se u bakterií v závislosti na fyziologickém stavu pohybuje v rozmezí 3 a 10 (Lin a Guarente 2003).



Obr. 4: Struktura nikotinamid adenin dinukleotidu (NAD⁺).

NAD⁺ bylo však relativně nedávno pomocí LC/MS analýzy buněčné RNA objeveno také na 5' konci RNA bakterií (Chen et al., 2009), později také kvasinek (Walters et al., 2017) a dokonce lidských buněk (Jiao et al., 2017). Díky nově vyvinutým metodám, NAD captureSeq (Cahová et al., 2015) a CapZyme-Seq (Vvedenskaya et al., 2018), byly identifikovány konkrétní molekuly RNA, u kterých se NAD⁺ čepička na 5' konci vyskytuje. Jsou mezi nimi převážně malé regulační RNA (sRNA) jako je RNA1 (viz 2.1.2), OxyS (účastní se regulace při oxidativním stresu), nebo třeba SibD a SibE (antitoxin sRNA). *In vivo* zastoupení NAD⁺ čepičky přesahovalo u těchto RNA 20 % (Vvedenskaya et al., 2018).

NAD captureSeq ([obr. 5](#)) využívá enzymu adenosindifosfát-ribosylcyklázy (ADPRC), který specificky modifikuje NAD⁺ alkynylalkoholem, na který je možné přidat měď katalyzovanou adicí azid spojený s biotinem. Díky afinitě biotinu k streptavidinu lze pak na streptavidinové kuličky specificky vylákat takto modifikované molekuly RNA. RNA je následně amplifikována a osekvenována (Cahová et al., 2015).



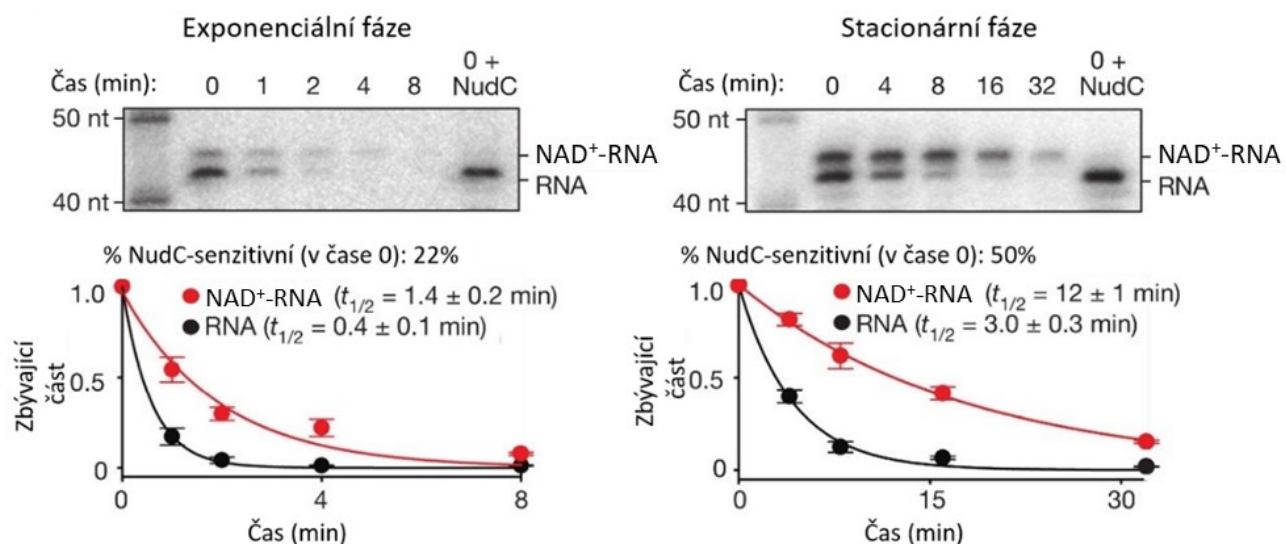
Obr. 5: Schéma metody NAD captureSeq. NAD-RNA je nejprve specificky v několika krocích biotinilována, a následně díky biotinu vychtána na streptavidinové kuličky. Zachycená RNA je pak reverzní transkripcí převedena na cDNA, namnožena a sekvenována (upraveno podle Cahová et al., 2015).

CapZyme-Seq využívá enzym NudC (případně obdobně fungující enzym Rai1, Jiao et al., 2017), který odštěpuje NMN od RNA s NAD⁺ čepičkou, takže na 5' konci takové RNA zbyde monofosfát (5'pApN...3', viz kapitola 2.3). Metodou „MASTER“ (massively systematic transcript end readout) lze zjistit charakter 5' konce RNA (Vvedenskaya et al., 2015), takže je možné rozlišit RNA původně s čepičkou (monofosfát na 5' konci) a bez čepičky (trifosfát na 5' konci). Touto metodou lze kvantifikovat zastoupení NAD⁺ čepičky *in vivo* u RNA se známou sekvencí (Vvedenskaya et al., 2018).

Přestože výsledky v některých publikacích hovoří jinak (Chen et al., 2009; Luciano a Belasco 2015), enzymem zodpovědným za přítomnost NAD⁺ čepičky na 5' konci RNA je pravděpodobně RNA polymeráza (Bird et al., 2016), která je známá schopností využít k iniciaci transkripce i jiné substráty, než jsou kanonické nukleotidy (více v kapitole 2.1.3). Nejnovější studie dokonce ukázala, že je NAD⁺ jako substrát k iniciaci transkripce schopna využít i mitochondriální RNA polymeráza (Julius et al., 2018). Všechny tyto důkazy však byly provedeny pouze *in vitro*, jednoznačný důkaz *in vivo* zatím podán nebyl.

Jedním z faktorů ovlivňující výběr substrátu pro iniciaci transkripce se ukázala být sekvence promotoru. Podmínkou pro iniciaci transkripce NAD^+ je přítomnost adeninu na pozici +1 (kódujícího vlákna), tedy transkripčním počátku (Bird et al., 2016). Důvodem je, že se NAD^+ podobně jako ATP (adenin je součástí molekuly NAD) může párovat pouze s thyminem na templátovém vlákně DNA. Kromě iniciačního nukleotidu +1 jsou významné z hlediska výběru iniciačního substrátu i další nukleotidy blízko počátku transkripce. Autoři článku (Vvedenskaya et al., 2018) využili již zmíněné metody CapZyme-Seq k analyzování všech 16 384 možných kombinací nukleotidů na pozicích -3 až +4 promotoru *lac* UV5. Na základě výsledků sestavili konsensus sekvenci pro využití NAD^+ jako substrát RNA polymerázou k iniciaci transkripce: $\text{H}_{-3}\text{R}_{-2}\text{R}_{-1}\text{A}_{+1}\text{S}_{+2}\text{W}_{+3}\text{W}_{+4}$. Oproti tomu anti-konsensus sekvence (stále s nezbytným adeninem na pozici +1), $\text{G}_{-3}\text{Y}_{-2}\text{Y}_{-1}\text{A}_{+1}\text{W}_{+2}\text{S}_{+3}\text{S}_{+4}$, vykazovala 40krát nižší účinnost při využití NAD^+ jako substrátu pro iniciaci transkripce. Transkripce s variacemi promotoru s jiným nukleotidem na pozici +1, než je adenin, neprodukovala žádnou RNA s NAD^+ čepičkou. Tato diplomová práce se taktéž zabývá sekvenčními požadavky na promotor při využití NAD^+ jako substrátu pro iniciaci transkripce.

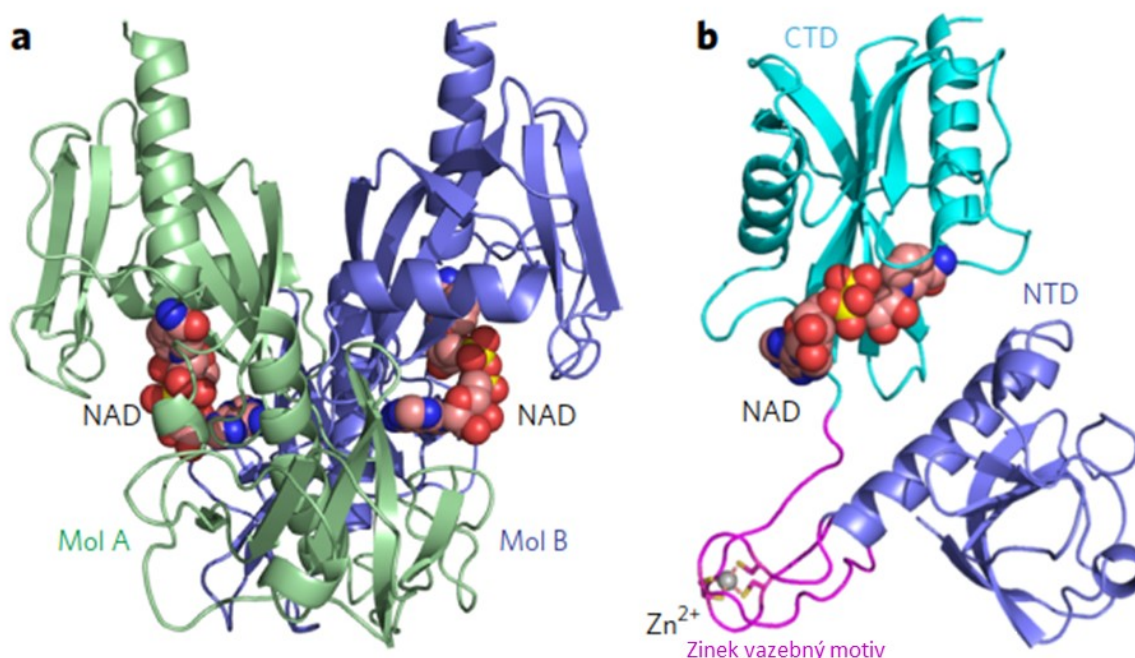
Další logickou otázkou je, jaký je význam NAD^+ čepičky na 5' konci RNA. Jednou z hypotéz je, že by NAD^+ čepička měla analogickou funkci jako 7-metylguanosinová čepička u eukaryot, která kromě jiného zvyšuje stabilitu RNA tím, že jí chrání před degradací RNázami (Shimotohno et al., 1977). Tuto hypotézu podporují výsledky z *in vitro* i *in vivo* experimentů, které ukazují zvýšenou stabilitu RNA s NAD^+ čepičkou oproti RNA bez čepičky (Cahová et al., 2015), (Bird et al., 2016). Stabilita a zastoupení NAD-RNA byla dokonce ještě zvýšena ve stacionární fázi růstu bakteriální kultury (obr. 6). To nahrává hypotéze, že je NAD^+ čepička důležitá při různých stresových podmínkách, kdy se v buňce snižuje míra transkripce i translace, ale je třeba zachovat některé důležité RNA. Tato hypotéza je rovněž podporována faktem, že většina RNA, u kterých bylo zjištěno větší zastoupení NAD^+ čepičky jsou malé RNA účastníci se regulace při stresových podmínkách (Cahová et al., 2015; Vvedenskaya et al., 2018).



Obr. 6: Efekt NAD⁺ čepičky na stabilitu RNA in vivo v různých fázích růstu bakteriální kultury. Levý obrázek ukazuje rozpad RNA v čase v exponenciální fázi růstu bakteriální kultury (červeně NAD-RNA, černě RNA bez čepičky). NAD-RNA byla asi 3krát stabilnější než RNA bez čepičky a její podíl byl zhruba 22 %. Pravý obrázek ukazuje rozpad RNA v čase ve stacionární fázi růstu bakteriální kultury (červeně NAD-RNA, černě RNA bez čepičky). NAD-RNA byla asi 4krát stabilnější a její podíl dosahoval 50 %. Jednalo se zde o RNA1 v kmeni *E. coli* s deletovaným genem pro enzym NudC (upraveno podle Bird et al., 2016).

2.3 NudC

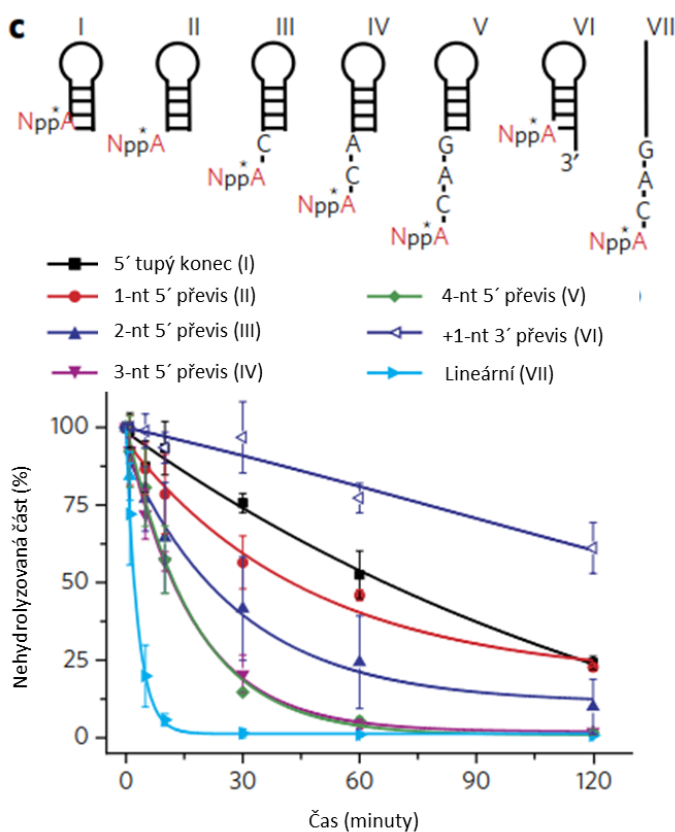
NudC je NAD(H) pyrofosfatáza patřící do rodiny Nudix hydroláz. Protein je tvořen z 257 aminokyselin o celkové hmotnosti 29,7 kDa (Frick a Bessman 1995). Podobně jako ostatní enzymy z rodiny Nudix hydroláz je katalytické centrum NudC tvořeno motivem smyčka-helix-smyčka složeným z 23 aminokyselin (Höfer et al., 2016; Srouji et al., 2017). NudC tvoří homodimer ([obr. 7](#)), přičemž každý monomer má jedno vazebné místo pro NAD(H) (Frick a Bessman 1995). Monomer NudC je tvořen ze dvou domén spojených zinek vázajícím linkerem – NTD je z větší části zodpovědná za dimerizaci, zatímco CTD obsahuje katalytický Nudix motiv a vazebnou kapsu pro NAD(H) (Höfer et al., 2016).



Obr. 7: Krystalová struktura enzymu NudC. (a) Dimer proteinu NudC složený ze dvou monomerů (jedna molekula zeleně, druhá molekula fialově). V obou aktivních místech enzymu jsou navázány molekuly NAD. (b) Detail monomeru NudC v komplexu s NAD – C-koncová doména znázorněna modře, N-koncová doména fialově a zinek vazebný motiv s navázaným zinkem růžově (převzato a upraveno podle Höfer et al., 2016).

NudC katalyzuje hydrolýzu širokého spektra substrátů, nicméně má silnou preferenci k NAD(H) oproti jiným substrátům. NAD(H) je za pomoci hořečnatých či manganatých kationtů hydrolyzováno na nikotinamid mononukleotid (NMN) a adenosin monofosfát (AMP) (Frick a Bessman 1995). Novější studie ukázala, že je jako substrát preferováno NAD(H) připojené na 5' konec jednovláknové RNA oproti volnému NAD(H) ([obr. 8](#), Höfer et al., 2016), což by mohlo naznačovat význam tohoto proteinu *in vivo* jako „decapping“ enzymu. Nutno však zmínit, že

tyto výsledky příliš nekorelují s naším pozorováním (viz kapitola 6.2). Mezi další substráty, které umí NudC štěpit patří NAD^+ , koenzym A a FAD (Vvedenskaya et al., 2018).



Obr. 8: Substrátová preference enzymu NudC. Graf znázorňuje preferenci enzymu NudC pro NAD připojené na 5' konec RNA s různou sekundární strukturou – (I) 5' tupý konec, (II) jedenukleotidový převis, (III) dvouukleotidový převis, (IV) trojnukleotidový převis, (V) čtyřnukleotidový převis, (VI) jedenukleotidový převis na 3' konci a (VII) lineární RNA. Z grafu je patrné, že NudC upřednostňuje NAD připojené na jednovláknovou RNA oproti dvojitáknové (převzato a upraveno podle Höfer et al., 2016).

3. Cíle práce

Nejprve se ve své práci věnuji izolaci enzymu NudC, který bude využit při studiu fenoménu NAD⁺ čepičky *in vivo* – NudC specificky odstraní NAD⁺ čepičku z celkové buněčné RNA, která pak bude degradována RNázou vyžadující monofosfát na 5' konci, a porovnáním enzymaticky ošetřeného a neošetřeného vzorku pomocí qPCR se zjistí poměrné zastoupení RNA s čepičkou. To by mohlo pomoci nastínit skutečný biologický význam této modifikace a ukázat, zda výsledky získané pomocí *in vitro* pokusů odpovídají situaci *in vivo*.

Hlavním cílem této práce je určení role sekvence promotoru při výběru NAD⁺ RNA polymerázou jako substrátu pro iniciaci transkripce. V neposlední řadě se pokusím (bohužel neúspěšně) porovnat RNA polymerázu *E. coli* a *B. subtilis* z hlediska výběru NAD⁺ jako substrátu pro iniciaci transkripce.

Dílčí cíle této práce:

- Izolace enzymu NudC pro budoucí *in vivo* pokusy s NAD⁺ čepičkou a ověření jeho aktivity.
- Určení závislosti výběru NAD⁺ jako substrátu pro iniciaci transkripce na sekvenci promotoru.
- Porovnání RNA polymerázy *E. coli* a *B. subtilis* z hlediska výběru NAD⁺ jako substrátu pro iniciaci transkripce.

4. Materiál a metody

4.1 Přístroje

4.1.1 Centrifugy

BECKMAN – Microfuge 20R

Chlazená centrifuga s maximální kapacitou 24 zkumavek (1,5ml).

Rotor FA241.5 s maximálním zrychlením $20.627 \times g$.

BECKMAN – Microfuge 20

Centrifuga s maximální kapacitou 24 zkumavek (1,5ml).

Rotor FA241.5 s maximálním zrychlením $20.627 \times g$.

BECKMAN – Allegra X-15R

Chlazená centrifuga s kapacitou pro kyvety 28x50 ml nebo 48x15 ml nebo 4x500 ml.

Rotor SX4750A s maximálním zrychlením $5.250 \times g$.

BECKMAN – Avanti J-26XPI

Chlazená centrifuga s možností výměny rotoru.

Rotor JA-10 s maximální kapacitou 6 kyvet (0,5l) a maximálním zrychlením $17.700 \times g$.

Rotor JA-25.50 s maximální kapacitou 8 kyvet (50ml) a maximálním zrychlením $75.600 \times g$.

GILSON – GmCLab

Stolní centrifuga pro krátké stáčení vzorků.

Rotor s kapacitou 8 zkumavek (1,5 nebo 2ml) a maximálním zrychlením $2.910 \times g$.

HETTICH – Universal 320 R

Chlazená centrifuga s možností výměny rotoru.

Rotor 1420-B s maximální kapacitou 24 zkumavek (1,5ml) a maximálním zrychlením $21.382 \times g$.

Rotor 1620-A: s maximální kapacitou 6 kyvet (50ml) a maximálním zrychlením $9.509 \times g$.

4.1.2 Třepačky a termostaty

BIOSAN – Ts-100 c Thermo Shaker

Termostát s možností třepání vzorků (250-1400 rpm).

Kapacita až 24 zkumavek (1,5ml), rozmezí teplot 4-100 °C.

BIOSAN – Multi Bio RS-24

Vertikálně otočná třepačka s kapacitou 26 mikrozkušavek.

BIOSAN – MR-1

Třepačka pro barvení gelů po SDS-PAAGE.

BIOSAN – Multifunctional Shaker PSU-20

Stolní třepačka s orbitálním, vibračním nebo reciprokým třepáním (20-250 rpm).

Brouwer – Thermostat

Termostát s možností třepání pro kultivaci bakteriálních kultur.

LAB SYSTEM – Biological Thermostat BT-120

Termostát pro inkubaci Petriho misek v rozmezí teplot 5-75 °C.

EPPENDORF – Thermostat 5320

Blokový termostát s maximální kapacitou 24 zkumavek (1,5ml).

Možnost nastavení 25 °C, 30 °C, 37 °C, 56 °C nebo 95 °C.

SCIENTIFIC INDUSTRIES – Vortex Genie 2

Vortex s dotykovým nebo kontinuálním režimem a rychlostí 600–3200 rpm.

STUART – Block Heater SBH 130D

Termostát s vyjímatelnými bloky.

Maximální kapacita 36 zkumavek (1,5ml), maximální teplota 130 °C.

INFORS HT – Multitron Pro

Třepačka s možností chlazení pro kultivaci kultur a indukci exprese proteinů.

4.1.3 Elektroforézy a zdroje napětí

BIO RAD – Power Pac 3000

Zdroj napětí pro elektroforézy (maximální napětí 3000 V).

LABNET INC. – Enduro 300 V Power Supplies

Zdroj napětí pro elektroforézy (maximální napětí 300 V).

NOVEX – Xcell Surelock Mini Cell Elfo System

Vertikální elektroforéza pro analýzu proteinů na gelech zakoupených od firmy Novex.

THERMO SCIENTIFIC – OWL Easycast B1A Mini Gel Elfo System

Horizontální elektroforéza pro analýzu DNA fragmentů.

THERMO SCIENTIFIC – OWL P10DS Dual Gel System

Vertikální elektroforéza pro analýzu vzorků značených radioizotopy.

4.1.4 Ostatní přístroje

ROCHE – LightCycler 480 Systém

Cycler s možností měřit fluorescenci pro kvantitativní PCR.

FUJI – BAS Cassette 2025

Kazeta s citlivou deskou používaná pro vyhodnocování gelů s radioaktivně značenými vzorky.

BIO-RAD – Molecular Imager FX

Phosphoimager

THERMO SCIENTIFIC – Nanodrop Lite

Spektrofotometr určený k měření koncentrace a čistoty nukleových kyselin.

SHIMADZU – UV – 1601PC UV – Visible

Spektrofotometr

LABPORT – KNFLAB

Vakuová pumpa

KERN – EG 2200

Analytické váhy s možností vážení v rozmezí 0,01 g – 2200 g.

KERN – ABJ 220-4NM

Analytické váhy s možností vážení v rozmezí 1 mg – 220 g.

MJ RESEARCH – PTC 200

Cycler s dvěma termobloky pro různé velikosti zkumavek

MJ RESEARCH – PTC 100

Cycler

HIELSCHER – UP 200S

Sonikační zařízení s výměnnými sondami

THERMO SCIENTIFIC – MINI 900EP15 Contamination and Radiation Monitor

Geiger-Müllerův přístroj pro měření ionizujícího záření.

BIOMETRA – Mididry D62

Sušička gelů se sušicí plochou 30 × 40 cm a maximální teplotou 90 °C.

4.2 Chemikálie a enzymy

4.2.1 Chemikálie

- [α - ^{32}P]-ATP – M.G.P.
- [α - ^{32}P]-UTP – M.G.P.
- [α - ^{32}P]-NAD – M.G.P.; LACOMED
- 2-merkaptoetanol – SERVA
- Agaróza pro použití v biotechnologiích – AMRESCO
- Agaróza pro elektroforézu – A.C.P.
- Ampicilin – BIOTIKA
- Injekční voda (Aqua pro injection) – BRAUN
- Bromfenolová modř
- Coomassie Brilliant blue G-250 – SERVA
- Dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4) - LACHEMA
- Dithiotreitol (DTT) – SERVA
- Etanol 96% - PENTA
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) - LACHEMA
- Fenol – APPLICHEM
- Fenylmetylsulfonyl fluorid (PMSF) – SERVA
- Fosforečnan disodný (Na_2HPO_4) – SERVA
- Gel Red – BIOTIUM
- Glycerol – SIGMA
- Hovězí sérum albumin (BSA) – SIGMA
- Chloramfenikol - SERVA
- Chlorid draselný (KCl) – LACHEMA
- Chlorid hořečnatý (MgCl_2) – PENTA
- Chlorid sodný (NaCl) – LACH-NER
- Chlorid vápenatý (CaCl_2) – LACH-NER
- Chloroform – PENTA
- Imidazol – SIGMA
- Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) – SIGMA

- Kanamycin – SERVA
- Kyselina boritá (H_3BO_3) – PENTA
- Kyselina fosforečná (H_3PO_4) – LACH-NER
- Metanol – LACH-NER
- NTPs (ATP, GTP, CTP, UTP) – ROCHE
- Peroxodisíran amonný (APS) – SIGMA
- Polyakrylamid (PAA) – SERVA
- Síran Hořečnatý (MgSO_4) – PENTA
- Tetrametyletylendiamin (TEMED) – SERVA
- Tris-acetát – SERVA
- Tris-HCl – SIGMA
- LB broth – SIGMA
- Xylene cyanol – LKB-PRODUKTER AB

4.2.2 Enzymy a pufrы

Enzymy

- EcoR1 (TAKARA) – restrikční endonukleáza
- HindIII (TAKARA) – restrikční endonukleáza
- RppH (NEB) – enzym odštěpující pyrofosfát z 5' konce nukleových kyselin
- J1 (naše laboratoř) – ribonukleáza z *B. subtilis*
- NudC (vlastní izolace) – enzym štěpící NAD na NMN a AMP
- Xrn1 (NEB) – exonukleáza vyžadující monofosfát na 5' konci nukleové kyseliny
- rSAP (NEB) – enzym odštěpující monofosfát z 5' konce nukleových kyselin
- SS III RT (INVITROGEN) – reverzní transkriptáza
- T4D ligase (NEB) – ligáza
- *E. coli* RNA polymerase, holoenzyme (NEB) – RNA polymeráza z *E. coli*
- *B. subtilis* RNA polymeráza (vlastní izolace) – RNA polymeráza z *B. subtilis*
- rDNase I (AMBION) - DNáza

Roztoky, média a pufrы

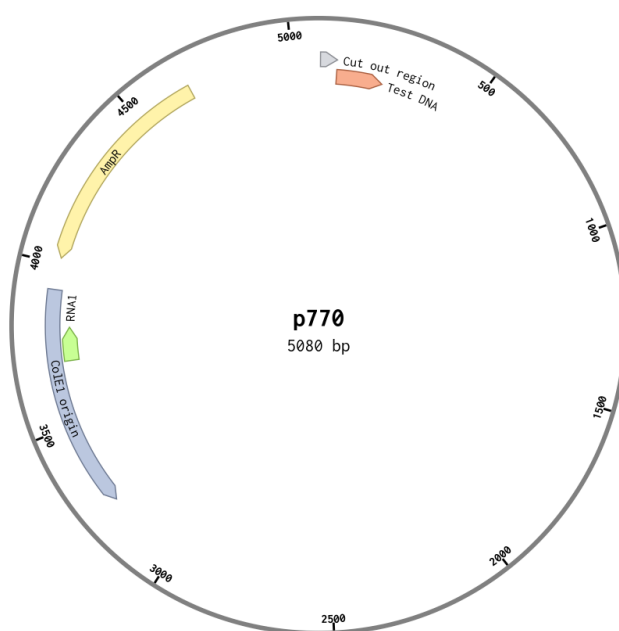
- 10× **M buffer** (TAKARA) – pufr pro štěpení enzymy EcoRI a HindIII
 - 100mM Tris-HCl, pH7.5; 100mM MgCl₂; 10mM Dithiothreitol; 500mM NaCl
- 10× **NEBuffer 3** (NEB) – pufr pro enzymatické reakce s proteiny Xrn1, RppH a NudC
 - 1 × složení: 100mM NaCl; 50mM Tris-HCl; 10mM MgCl₂; 1mM DTT; pH 7.9
- 10× **T4 DNA Ligase Reaction Buffer** (NEB) – pufr pro ligaci s T4D ligázou (NEB)
 - 1 × složení: 50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM ATP; 10 mM DTT; pH 7.5
- 10× **Standard Taq Reaction buffer** (NEB) – pufr použitý pro annealing
 - 10mM Tris-HCl (pH 8.3); 50mM KCl; 1,5mM MgCl₂
- 10× **DNase I Buffer** (AMBION) – reakční pufr pro rDNase I
 - 1 × složení: 10mM Tris-HCl (pH 7,5); 2,5mM MgCl₂; 0,5mM CaCl₂
- **Transkripční pufr** – pufr pro transkripci *in vitro*
 - 1 × složení: 40mM Tris; 10mM MgCl₂; 1mM DTT
- 20× **NuPAGE MES SDS Running buffer** (NOVEX) – pufr pro SDS-PAGE
 - 1 × složení: 50mM MES; 50mM Tris Base (pH 7,3); 0,1% SDS; 1mM EDTA

- **4× SDS loading dye** – roztok pro nanášení vzorků na SDS-PAGE
 - 1 × složení: 125mM Tris-HCl (pH 8); 10% glycerol; 0,1% SDS; 0,05% bromfenolová modř; 2% 2-merkaptoetanol
- **TAE** – pufr pro agarózovou elektroforézu
 - 1 × složení: 40mM Tris-acetát; 1mM EDTA, pH 8
- **TBE** – pufr pro polyakrylamidovou elektroforézu
 - 1 × složení: 90mM Tris-HCl (pH 8); 2mM EDTA; 90mM H₃BO₃
- **Ředící pufr** – pufr pro ředění RNA polymerázy
 - 2M Tris-HCl (pH 8); 2M NaCl; 50% glycerol
- **Transkripční pufr** – pufr pro transkripci *in vitro*
 - 1 × složení: 40mM Tris; 10mM MgCl₂; 1mM DTT
- **STOP solution** – roztok pro ukončení transkripce
 - 95% formamid; 0,05% bromfenolová modř; 20mM EDTA (pH 8); 0,05% xylene cyanol
- **NudC uchovávací pufr** – pufr pro uchovávání NudC
 - 50mM Tris-HCl (pH8); 0.5M NaCl; 50mM KCl; 1mM MgCl₂; 5mM DTT; 50% glycerol
- **NudC Tris pufr** – pufr pro izolaci NudC
 - 50mM TrisHCl (pH 8); 1M NaCl; 5mM MgSO₄; 5mM 2-ME; 5% glycerol; 5mM imidazol
- **Fosfátový pufr** – pufr pro izolaci RNA polymerázy z *B. subtilis*
 - 300mM NaCl; 50mM Na₂HPO₄; 3mM 2-merkaptoetanol; 5% glycerol; 1mM PMSF
- **RNAP uchovávací** – pufr pro uchování RNA polymerázy z *B. subtilis*
 - 50mM Tris-Cl (pH 8); 100mM NaCl; 3mM 2-merkaptoetanol; 50% glycerol
- **LB médium** – médium pro kultivaci bakteriálních kultur
 - Složení pro 1 litr: 25 g LB broth (10 g trypton; 5 g kvasinkový extrakt; 10 g NaCl); doplnit dH₂O do 1 litru
- **Bradfordovo činidlo** – roztok pro měření koncentrace a detekci proteinů
 - Složení pro 1 lir: 100 mg Coomassie Brilliant blue G-250 v 50 ml etanolu; 100 ml 85% H₃PO₄; doplnit dH₂O do 1 litru

4.3 Vektory

4.3.1 Plazmid p770

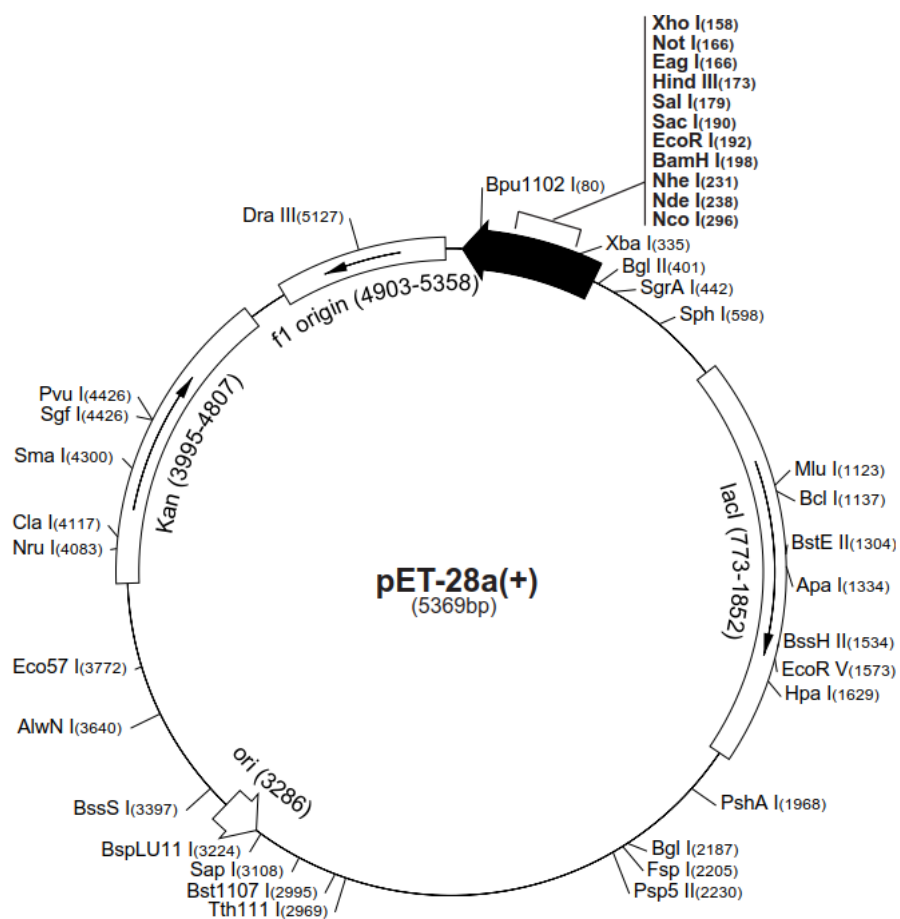
Plazmid p770 je odvozený od plazmidu ColE1 s endogenní sekvencí pro RNAI, genem pro β -laktamázu zajišťující resistenci k ampicilinu a sekvencemi, které jsou rozpoznávány restriktázami EcoR1 a HindIII, pro vnášení inzertů (obr. 9). V průběhu práce na tomto projektu jsem do plazmidu p770 vložil přes 70 promotorových sekvencí. Plazmid byl pak použit jako DNA templát pro transkripční pokusy. Plazmid byl získán od Rossové a kolektivu (Ross et al., 1990).



Obr. 9: Plazmid p770 s vyznačeným počátkem replikace, resistencí k ampicilinu, sekvencí RNAI, oblastí v MCS, která bude vyštěpena a nahrazena testovacím promotorem, a DNA, která bude pod tímto promotorem přepisována. Obrázek byl vytvořen v programu Benchling.

4.3.2 Plazmid pET-28a(+)

Vektor od firmy Novagen určený především pro expresi a purifikaci proteinů. Plazmid obsahuje resistenci pro kanamycin jako selekční marker, multiklonovací místo (MCS) pro vnášení požadovaných inzertů, jejichž exprese je následně řízena T7 promotorem, a His-tag pro snadnou izolaci proteinu (obr. 10). V mé práci byl tento plazmid s vloženým genem pro NudC použit pro expresi enzymu NudC. Plazmid pET-28a(+) – NudC byl v expresním kmeni *E. coli* BL21 (DE3) obdržen od (Bird et al., 2016).



Obr. 10: Plazmid pET-28a(+) je často využívaným expresním vektorem. V této práci byl použit pro získání enzymu NudC. Obrázek získán ze stránek výrobce.

4.4 Bakteriální kmeny

4.4.1 *E. coli*

BL21 (DE3)

BL21 (DE3) je kmen *E. coli* určený pro expresi proteinů ve vektorech s T7 promotory. Buňky mají inaktivované proteázy Lon a OmpT pro maximální možný výtěžek proteinu a gen pro T7 polymerázu pod kontrolou LacUV5 promotoru indukovatelného IPTG. V této práci byl kmen použit pro expresi proteinu NudC v expresním vektoru pET-28a(+) (kmen v laboratoři označen jako **LK 1827**).

DH5α

DH5α (INVITROGEN) je přirozeně kompetentní kmen *E. coli* s vysokou efektivitou transformace. Kmen byl v této práci použit pro amplifikaci více než 70 plazmidů odvozených od vektoru p770. Divoký typ kmene DH5α neobsahuje žádné plazmidy, což je pro nás velice důležité a byl to jeden z důvodů výběru právě toho kmene.

4.4.2 *B. subtilis*

Jediným použitým kmenem *B. subtilis* je kmen **MH 5636** (v laboratoři označen jako **LK 1723**) (Qi a Hulett 1998). Tento kmen má histidinovou kotvu na β' podjednotce RNA polymerázy, a proto jej lze snadno využít k její izolaci.

4.5 Elektroforéza

4.5.1 Horizontální agarózová elektroforéza

Elektroforéza v aparatuře OWL Easycast B1A používaná především pro DNA vzorky, ale pro ověření integrity RNA.

Postup:

- Připravit a očistit aparaturu pro elektroforézu a hřeben.
- Ve 100ml Erlenmeyerově baňce připravit 1% agarózu: navážít 0,5 g agarózy pro biotechnologické použití a rozpustit v 50 ml TAE pufru.
- Ochladit roztok pod 50 °C a přidat 5 μ l fluorescenční barvičky nukleových kyselin Gel Red (10.000× ředění).

- Roztok opatrně promíchat (tak, aby nevznikly bubliny), nalít do elektroforetické aparatury a přidat hřeben.
- Po ztuhnutí gelu (cca 30 minut) zalít aparaturu TAE puforem tak, aby byl celý gel ponořen a vyjmout hřeben.
- Do hřebenem vytvořených jamek nanést 10 μ l vzorku v poměru 5:1 s 6 \times DNA Loading Dye (THERMO SCIENTIFIC).
- Pokud je třeba, nanést do jedné z jamek DNA marker (v této práci byl využíván GeneRuler 1kbDNA ladder od firmy THERMO SCIENTIFIC).
- Připojit aparaturu ke zdroji o napětí 5 V/cm po dobu přibližně 45 minut.
- Gel analyzovat pomocí UV světla, případně vyříznout vybrané části pro následnou izolaci.

4.5.2 Vertikální polyakrylamidová elektroforéza

Elektroforéza v aparatuře OWL P10DS Dual pro analýzu výsledků transkripce *in vitro* s radioaktivně značenými nukleotidy.

Postup:

- Připravit a očistit aparaturu, hřeben a skla se spacersy pro elektroforézu.
- Ve 300 ml Erlenmeyerově baňce připravit 2% agarózu: navážit 2 g agarózy pro elektroforézu a rozpustit ve 100 ml TBE pufru.
- Nalít připravenou agarózu do spodní části aparatury a umístit skla oddělená spacersy.
- Po ztuhnutí gelu (přibližně 15 minut) připravit polyakrylamidový gel: do 50ml zkumavky nalít 30 ml 7% PAA, 300 μ l APS, 30 μ l TEMED a otáčením zkumavky promíchat.
- Polyakrylamidový gel opatrně nalít mezi skla, vsadit hřeben a nechat přibližně 30 minut tuhnout.
- Aparaturu zalít TBE puforem a vyjmout hřeben.
- Do hřebenem vytvořených komůrek nanést 10 μ l vzorku získaného při transkripci *in vitro*.
- Aparaturu zapojit ke zdroji na napětí 180 V po dobu přibližně 90 minut.
- Gel z aparatury přenést na filtrační papír, překrýt fólií a dát na sušičku.

- Gel nechat sušit ve vakuu 40 minut při 90 °C a následně nechat minimálně 30 minut chladit (stále v evakuované sušičce).
- Gel přenést do kazety BAS Cassette 2025 a exponovat na citlivou desku přes noc.
- Desku snímat skenerem Molecular Imager FX a výsledek analyzovat v programu Quantity One.

4.5.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE je denaturační polyakrylamidová elektroforetická metoda použitá k analýze proteinů. Proteiny jsou působením SDS denaturovány a jsou separovány na základě jejich hmotnosti. Používána byla aparatura Xcell Surelock Mini a originální předpřipravené gely NuPage 4-12% Bis-Tris gel od firmy Thermo Scientific.

- Očistit a sestavit aparaturu Xcell Surelock Mini Cell.
- Z předpřipravených gelů odstranit záslepky a umístit je do aparatury.
- Aparaturu naplnit 1× NuPAGE MES SDS Running buffer (20× zředěný zásobní roztok).
- Ke vzorkům přidat 1:4 4× SDS loading dye.
- Vzorky zahřát po dobu 5 minut při 95 °C.
- Vzorky nanést na gel společně s markerem – Novex Sharp Prestained Protein Standard.
- Připojit aparatury ke zdroji o napětí 200 V po dobu 35 minut.

Takto připravené gely jsou z elektroforézy vyňaty a barveny pomocí SimplyBlue SafeStain:

- Gel umístit do krabičky s přibližně 100 ml destilované vody.
- Zahřívát v mikrovlnné troubě po dobu 60 vteřin.
- Krabičku nechat 60 vteřin třepat na překlopné třepačce při nízkých otáčkách a opatrně slít vodu.
- Předchozí kroky minimálně 2x opakovat.
- Přidat do krabičky 20 ml barviva SimplyBlue SafeStain.
- Zahřívát v mikrovlnné troubě 45 až 90 vteřin.
- Krabičku nechat 5 minut třepat na překlopné třepačce při nízkých otáčkách a opatrně slít barvicí roztok.

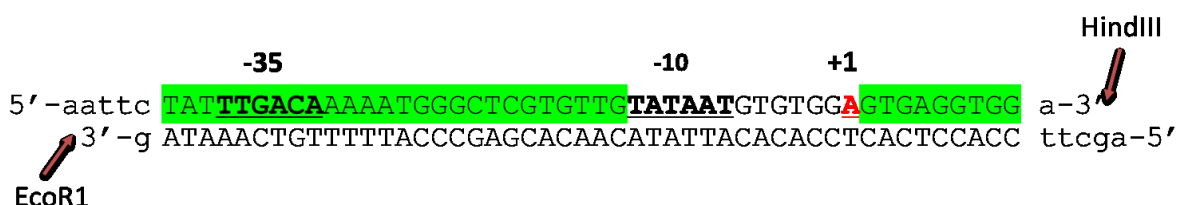
- Odbarvit gel postupným přidáváním, třepáním a sléváním vody dle potřeby až do optimálního odbarvení gelu.

4.6 Klonování

Klonování je pomnožení určitého úseku DNA v organismu. V této práci používám klonování pro namnožení více než 70 různých plazmidů, které následně slouží jako templát pro transkripční pokusy *in vitro*. V prvním kroku je třeba navrhnout a získat dva komplementární úseky DNA s lepivými přesahy pro snadné vnesení do vektoru a provést jejich annealing. Tato sekvence DNA bude později sloužit jako promotor pro transkripci *in vitro*. Dále je potřeba vybrat a připravit vhodný vektor pro vnesení inzertu do organismu (v tomto případě se jedná o plazmid p770): izolace plazmidu z bakterií, restriční štěpení (tak, aby byly lepivé konce komplementární s inzertem), agarózová elektroforéza a následná izolace linearizovaného plazmidu z gelu. Dále je třeba zaligovat inzert do plazmidu. S takto vytvořenými vektory je možno transformovat bakterie, ve kterých bude vektor pomnožen a následně izolován.

4.6.1 Návrh sekvence DNA

Hlavní náplní této práce je zjistit vliv promotoru na výběr substrátu pro iniciaci transkripce. Toho bylo docíleno tak, že byly různé úseky DNA, které fungují jako promotor, vloženy do plazmidu p770 a následně použity jako templát pro transkripci. Plazmid je linearizován dvěma restričními enzymy HindIII a EcoRI tak, že vznikají přesahy AATT na jednom konci (5'), a AGCT na druhém konci (5'). Navržené sekvence proto mají na svých koncích komplementární přesahy pro snadnou ligaci plazmidu. Mezi těmito restriktázami definovanými úseky je pak samotná sekvence promotoru bez operátorové oblasti (úsek bývá od -40 do +10, viz [obr. 11](#)). Tyto promotory jsou povětšinou odvozené od jednoho z promotorů *lacUV5*, *Pveg*, *RNAI* nebo *rrnB P1*.



Obr. 11: Příklad navržené promotorové sekvence. Jedná se o hybridní promotor *Pveg* (zeleně) a *LacUV5*. jsou vyznačeny úseky -35, -10, +1 a lepivé úseky komplementární s přesahy generovanými restričními endonukleázami *EcoR1* a *HindIII*.

Navržené oligonukleotidové sekvence objednáváme u firmy East Port Praha, která je dodává ve formě dehydratovaného prášku. Podle instrukcí v přiložené dokumentaci je k oligonukleotidům přidáno takové množství vody, aby jejich výsledná koncentrace byla 100 μ M. Následně se roztok promíchá a nechá přes noc rozpouštět v lednici při teplotě 5 °C.

4.6.2 Annealing

Annealingem je myšlen proces spojování dvou komplementárních vláken nukleové kyseliny za vzniku dvojvlákna. Dva komplementární oligonukleotidy z předchozího kroku (4.6.1) je třeba nejprve spojit, než je možné je zaligovat do vektoru.

- Do 500 μ l zkumavky připravit směs na annealing: 80 μ l injekční vody, 5 μ l od obou komplementárních oligonukleotidů (100 μ M) a 10 μ l 10 \times Standard Taq Reaction buffer.
- Směs dát do cycleru: 95 °C po dobu 5 minut a pak ubírat teplotu rychlostí 1 °C za minutu až na teplotu 25 °C. Poté chladit na 4 °C až do vyzvednutí vzorků z cycleru.
- Vzorky uchovávat při nízké teplotě (4 °C), případně zamrazit pro dlouhodobější uchování.

4.6.3 Restrikční štěpení

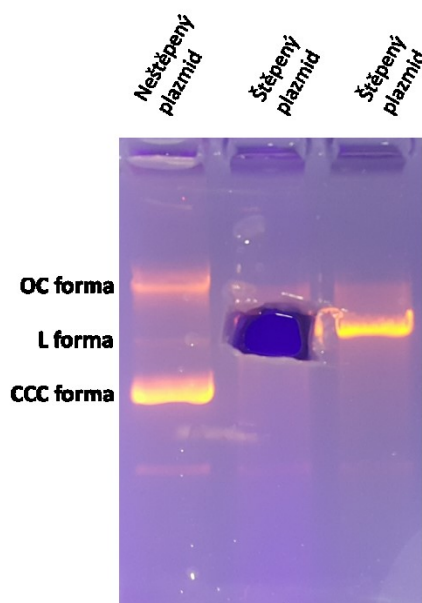
Restrikční štěpení zde slouží pro linearizaci vektoru a pro vytvoření lepivých konců pro snadnou ligaci inzertu. V tomto případě byl štěpen plazmid p770, izolovaný podle 4.6.8 z kmene **!**, enzymy HindIII a EcoR1.

- Připravit restrikční směs: do 1,5ml zkumavky smíchat 2 μ l 10 \times M buffer, 0,9 μ l enzymu EcoR1, 0,9 μ l enzymu HindIII a doplnit vodou do 20 μ l.
- Inkubovat 120 minut při teplotě 37 °C.
- Inaktivovat enzymy zahřátím směsi na 65 °C po dobu 20 minut.

4.6.4 Izolace plazmidu z gelu

Pro efektivní zaligování inzertu do linearizovaného plazmidu je potřeba zbavit se fragmentu vzniklého při štěpení dvěma restriktázami. Dále je třeba odstranit nelineární plazmid. Toho lze docílit rozdělením jednotlivých úseků DNA na agarózové elektroforéze, následným vyříznutím části reprezentující linearizovaný plazmid a jeho izolací. Plazmid byl v tomto případě izolován pomocí komerční soupravy QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

- Vzorek z restrikčního štěpení (4.6.3) nanést na agarózový gel a pustit elektroforézu (podle 4.5.1).
- Pod UV lampou vyříznout proužek v gelu odpovídající lineárnímu plazmidu ([obr. 12](#)) a přenést do 1,5ml zkumavky. V tomto kroku je třeba pracovat rychle, aby nedošlo k poškození DNA UV světlem.



Obr. 12: Snímek gelu s neštěpeným plazmidem a dvěma štěpenými plazmidy. U neštěpeného plazmidu jsou vidět 3 jeho konformace: uzavřený kruh (CCC forma), lineární plazmid (L forma, velice slabý proužek) a otevřený kruh s jednovláknovým přerušením (OC forma). Štěpený plazmid má téměř exkluzivně lineární formu (na gelu je vidět jaká část byla vyříznuta).

- Zvážit vyříznutý gel a přidat trojnásobné množství QG pufru (300 μ l na 100 mg gelu).
- Vzorek inkubovat v 50 °C po dobu minimálně 10 minut (není-li gel zcela rozpuštěn, je třeba prodloužit inkubaci). Vzorek jednou za 3 minuty vortexovat.
- Přidat isopropanol 1:1 k původní hmotnosti gelu (100 μ l na 100 mg gelu).
- Roztok přenést na QIAprep kolonku se silikagelovou membránou a centrifugovat 60 vteřin při pokojové teplotě a zrychlení 17.900g (stejně zrychlení použito i v ostatních krocích).
- Odsranit prošlou frakci a přidat na kolonku 500 μ l QG pufru pro odstranění zbytků agarózy. Centrifugovat 60 vteřin.
- Odstranit prošlou frakci a přidat 750 μ l PE pufru. Inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. Centrifugovat 60 vteřin.

- Odstranit prošlou frakci a centrifugovat dalších 60 vteřin pro odstranění zbytků pufru.
- Přemístit kolonku do čisté zkumavky, přidat 30 μ l EB pufru a centrifugovat 60 vteřin.
- Změřit koncentraci izolovaného plazmidu na zařízení nanodrop.

4.6.5 Ligace

Ligace slouží ke spojení dvou úseků DNA. V tomto případě byl inzert (4.6.1) a linearizovaný plazmid p770 (4.6.4) spojeny T4DNA ligázou za vzniku cirkulárního vektoru.

- Připravit ligační směs: do 1,5 ml zkumavky přidat 1 μ l T4DNA pufru s ATP, 1 μ l inzertu (4.6.2), 50 ng plazmidu (4.6.5) a doplnit vodou do 9 μ l.
- Ke směsi přidat 1 μ l T4DNA ligázy.
- Inkubovat v 16 °C přes noc (čas inkubace lze zkrátit).

4.6.6 Transformace

Pro pomnožení vyrobeného vektoru je nejlépe vložit ho do nějakého mikroorganismu. K tomu slouží transformace. V této práci jsem všechny DNA templáty v plazmidech p770 transformoval do přirozeně kompetentních bakterií *E. coli* kmene DH5 α metodou teplotního šoku (Hanahan 1983). Tento kmen neobsahuje žádné plazmidy.

- Kompetentní buňky *E. coli* DH5 α vyndat z mrazáku (-80 °C) a nechat rozmrazit na ledu (200 μ l buněk na každý vzorek).
- Do 1,5ml zkumavek rozpipetovat 10 μ l ligační směsi (4.6.5).
- Do jedné 1,5ml zkumavky dát místo ligační směsi 10 μ l injekční vody a do jedné 50 ng linearizovaného plazmidu (4.6.4). Tyto budou sloužit jako negativní kontroly transformace.
- Rozmrzlé kompetentní buňky promíchat a přidat po 200 μ l do každé zkumavky.
- Zkumavky lehce protřepat a nechat inkubovat 30 minut na ledu.
- Zahřát zkumavky na 42 °C po dobu 90 vteřin (teplotní šok) a nechat schladit na ledu po dobu 5 minut.
- Přidat do každé zkumavky 1 ml LB média, zaparafilmovat a nechat třepat 60 minut v 37 °C. U úspěšně transformovaných buněk se takto naexprimuje produkt genu rezistence k ampicilinu.

- Buňky krátce stočit na centrifuze na maximální otáčky a odlít většinu supernatantu.
- Resuspendovat buňky ve zbylém médiu (mělo by zbýt přibližně 200 μ l).
- Buňky sterilní skleněnou hokejkou vysít na Petriho misky s LB agarem a ampicilinem.
- Přes noc nechat inkubovat v 37 °C a jednotlivé misky porovnat s kontrolou (Obr. 15).

4.6.7 Sekvenace a pomnožení transformovaných buněk

Z misek s transformovanými buňkami je vždy vybrán pár monoklonií (klony jediné transformované buňky), u kterých je následně nutné ověřit úspěšnost transformace. Úspěšnost transformace se dá ověřit minipreparací plazmidu z dané kolonie a následné sekvenací pomocí sekvenátoru „nové generace“ od firmy Illumina. Tuto sekvenaci jsem neprováděl osobně, ale byla prováděna ve specializované laboratoři. Sekvenace byla prováděna podle námi poskytnutého primeru, který je komplementární s úsekem na plazmidu nacházejícím se v blízkosti úseku, kde by se měl nacházet inzert.

Výsledná sekvence (čitelných asi 600 nukleotidů) se porovná se sekvencí plazmidu a určí se správnost inserce. Pokud je inzert umístěn v plazmidu správně a nemá žádné mutace, může se pokračovat k pomnožení klonů s inzertem.

- Do 300ml Erlenmeyerovy baňky sterilně nad kahanem nalít 100 ml LB média.
- Ze zásobního roztoku ampicilinu (50 mg/ml) přidat 200 μ l ampicilinu na výslednou koncentraci 100 μ g/ml).
- Do tohoto média sterilní špičkou přeočkovat osekvenovanou kolonii z Petriho misky.
- Stejným způsobem připravit kontrolní Erlenmayerovu baňku bez zaočkování bakterií.
- Erlenmeyerovu uzavřít prodyšným špuntem a nechat přes noc třepat při teplotě 37 °C.
- Opticky ověřit, zda je médium zakalené (bakterie vyrostly) a že není zarostlá kontrola.

- Připravit 2 glycerinové konzervy pro uchování bakterií v -80 °C (pro možnost jejich opětovného namnožení): odebrat 850 µl narostlé kultury a důkladně smíchat s 150 µl glycerolu. Uložit konzervy do -80 °C pro dlouhodobé skladování.

4.6.8 Izolace plazmidové DNA-Midiprep

Buňky *E. coli* mají za správných podmínek velice krátkou dobu zdvojení, a proto je možné v nich rychle a efektivně namnožit transformovaný plazmid (za předpokladu, že je v něm nějaký gen poskytující buňce výhodu – v našem případě rezistenci k ampicilinu). Samotná izolace plazmidu z buněk byla prováděna pomocí komerční soupravy Wizard plus MidiPrep purification system (PROMEGA), která poskytuje vysoké výtěžky izolovaného plazmidu.

- Narostlou bakteriální kulturu (4.6.7) přelít do dvou 50ml zkumavek a centrifugovat při zrychlení 10.000×g ve 4 °C a po dobu 10 minut.
- Odlít supernatant a do každé zkumavky přidat 1,5 ml Cell Resuspension Solution.
- Resuspendovat buňky a spojit obsah obou zkumavek dohromady.
- Přidat 3 ml Cell Lysis Solution a promíchat převrácením zkumavky.
- Přidat 3 ml Cell Neutralization Solution a opět promíchat převrácením.
- Centrifugovat při zrychlení 5.250×g ve 4 °C po dobu 10 minut.
- Supernatant s plazmidy opatrně přelít do nové 50ml zkumavky, přidat 10 ml resinu a promíchat.
- Zapojit kolonku ze soupravy na vývěvu, přelít do ní obsah zkumavky a pustit vodu. Nechat pod tlakem protéct.
- Přidat 10 ml Column Wash Solution do kolonky a nechat protéct. Opakovat 2x. V těchto krocích dávat pozor, aby směs na kolonce nevyschla.
- Spodní část kolonky s filtrem (obsahující plazmid) uříznout a vložit do 1,5ml zkumavky.
- Centrifugovat při zrychlení 10.000×g po dobu 2 minut.
- Přenést kolonku do nové zkumavky a přenést na ni 300 µl vody předehřáté na 68 °C.
- Centrifugovat při zrychlení 10.000×g po dobu 20 vteřin.
- Odstranit kolonku a přenést prošlou frakci s plazmidem do nové 1,5ml zkumavky.

4.6.9 Fenol-chloroformová extrakce

Plazmidy izolované metodou uvedenou v předchozí části (4.6.8) mohou být kontaminovány různými proteiny. Protože budou tyto plazmidy využívány jako templát pro transkripci *in vitro*, je nezbytně nutné, aby neobsahovaly žádné RNázy. Proto byly všechny plazmidy, používané v transkripčních experimentech, přečištěny fenol-chloroformovou extrakcí, díky které je možné oddělit zbytky proteinů od plazmidové DNA a následně precipitovány alkoholem.

- Změřit objem vzorku (z 4.6.8) a přidat fenol 1:1. Zaparafilmovat a umístit na otočnou třepačku na dobu 5 minut.
- Centrifugovat směs při zrychlení 13.200×g po dobu 5 minut.
- Odebrat vodnou fázi do nové zkumavky a přidat směs fenolu s chloroformem (v poměru 1:1) 1:1. Zaparafilmovat a umístit na otočnou třepačku na dobu 5 minut.
- Centrifugovat směs při zrychlení 13.200×g po dobu 5 minut.
- Odebrat vodnou fázi do nové zkumavky a přidat chloroform 1:1. Zaparafilmovat zkumavku a nechat na otočné třepačce po dobu 5 minut.
- Centrifugovat směs při zrychlení 13.200×g po dobu 5 minut.
- Odebrat vodnou fázi do nové zkumavky, změřit její objem. Přidat 3M octan sodný 1/10 objemu vzorku a 96% etanol 2,2× objem vzorku.
- Směs promíchat a uložit do -80 °C po dobu 20 minut.
- Centrifugovat směs při zrychlení 12.000×g po dobu 15 minut a při teplotě 4 °C.
- Opatrně odstranit supernatant a přidat k peletu 50 µl 70% chlazeného etanolu.
- Centrifugovat směs při zrychlení 12.000×g po dobu 1 minuty a při teplotě 4 °C.
- Odstranit supernatant a pelet sušit v exsikátoru (ve vakuu) po dobu 20 minut.
- Pelet rozpustit v 50 µl injekční vody (přes noc v lednici) a změřit koncentraci a čistotu DNA přístrojem nanodrop.

4.7 Izolace a práce s proteiny

Většina enzymů používaných v této práci byla získána komerčně, případně vypůjčena od kolegů či z jiné laboratoře. Některé proteiny však dostupné nebyly, a proto bylo třeba je izolovat. Jedná se o RNA polymerázu *B. subtilis* a enzym NudC štěpící NAD⁺ na AMP a NMN.

4.7.1 Izolace RNA polymerázy *B. subtilis*

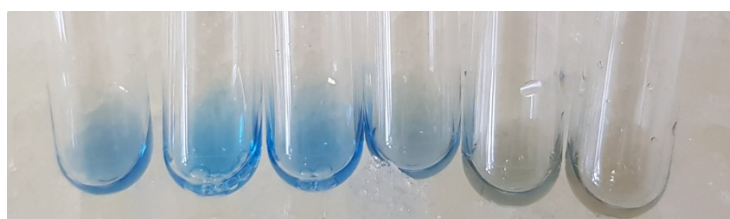
K izolaci RNA polymerázy *B. subtilis* byl použit kmen této bakterie MH5636 s histidinovou kotvou na β' podjednotce RNAP. Protože bakterie sama od sebe produkuje velké množství tohoto enzymu (v podmínkách hojnosti živin), nebylo nutné nijak indukovat expresi.

- Zaočkovat kmen *B. subtilis* MH5636 do 20 ml LB média s chloramfenikolem (o koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$) a nechat třepat přes noc při 37 °C.
- Změřit $\text{OD}_{600\text{nm}}$ a přeočkovat do 1 litru LB média (bez antibiotika) na $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,03$.
- Nechat narůst na třepačce při 37 °C přibližně na $\text{OD}_{600\text{nm}}=1$.
- Buňky chladiť 10 minut na ledu a pak centrifugovat při zrychlení 8000 $\times g$, 4 °C a po dobu 10 minut.
- Odstranit supernatant a buňky resuspendovat ve 40 ml fosfátového pufru za použití skleněné či plastové sterilní pipety.
- Směs přelít do 50ml zkumavky a centrifugovat při zrychlení 3.500 $\times g$, 4 °C po dobu 10 minut a odstranit supernatant. Po tomto kroku je možné buňky zamrazit v -20 °C.

Následuje proces izolace proteinu pomocí afinitní chromatografie, kdy protein označený histidinovou kotvou zůstane na rozdíl od všech ostatních proteinů přichycen na kovových iontech. Takto lze přes histidinovou kotvu na β' podjednotce izolovat celou RNA polymerázu (bez faktoru sigma).

- Přidat k zamraženému peletu 20 ml fosfátového pufru a nechat rozmraznout za občasného vortexování.
- Směs sonikovat při výkonu 50 % 20 $\times 10$ vteřin, po každém opakování minimálně minutu chladiť na ledu.
- Přenést směs do kyvet s kulatým dnem a centrifugovat ve 4 °C po dobu 15 minut při zrychlení 26.000 $\times g$. Supernatant přepipetovat do nové 50ml zkumavky.
- Mezitím je třeba ekvilibrovat Ni-NTA agarózu (QIAGEN): k 1,5 ml Ni-NTA agarózy přidat 10 ml fosfátového pufru, promíchat, centrifugovat 2 minuty při zrychlení 2000 $\times g$. Odstranit pufr a agarózu ještě jednou promýt stejným způsobem.
- Supernatant přelít k Ni-NTA agaróze a třepat ve vodorovné poloze na ledu alespoň 30 minut.

- Připravit kolonku se silikonovou hadičkou (pro zvýšení hydrostatického tlaku) a umístit pod ní nádobu na sběr tekutiny. Kolonku ekvilibrovat 10 ml fosfátového pufru a následně na ni nalít směs s Ni-NTA agarózou.
- Kolonku propláchnout 30 ml fosfátového pufru a následně 30 ml fosfátového pufru s 30mM imidazolem (odstraní slabě navázané proteiny na agarózu).
- Odstranit hadičku a eluovat polymerázu fosfátovým pufrem s 400mM imidazolem do 10 frakcí o objemu cca 0,5ml.
- Provést orientační zkoušku na přítomnost proteinů v jednotlivých frakcích: ve zkumavce smíchat 200 μ l Bradfordova činidla a 5 μ l vzorku ([obr. 13](#)).
- Frakce, u kterých vyšla zkouška pozitivně analyzovat pomocí SDS-PAGE.



Obr. 13: Orientační zkouška Bradfordovým činidlem. V přítomnosti proteinu činidlo jasně zmodrá (4 zkumavky vlevo), v jeho nepřítomnosti zůstává barva činidla stejná (dvě zkumavky napravo). Podle intenzity zabarvení lze orientačně odhadnout koncentraci proteinu.

4.7.2 Izolace enzymu NudC

Enzym NudC jsem izoloval z bakterie *E. coli* BL21 (DE3) s plazmidem pET28a(+) s vloženým genem pro NudC (obdržen od Bird et al., 2016). Tento plazmid nese rezistenci ke kanamycinu a exprese inzertu je indukovatelná IPTG.

- Zaočkovat *E. coli* nesoucí plazmid s genem pro NudC do 100 ml LB média (v 300ml Erlenmeyerově baňce) s kanamycinem o koncentraci 50 μ g/ml.
- Nechat přes noc na třepačce při 37 °C.
- Změřit OD_{600nm} a přeočkovat do 1 litru LB média s kanamycinem (c=100 μ g/ml) na OD_{600nm}=0,03.
- Nechat růst na třepačce při teplotě 37 °C. Průběžně měřit optickou denzitu.
- Po dosažení OD_{600nm}=0,4-0,5 odebrat vzorek (T0) pro SDS-PAGE a pokračovat v růstu při pokojové teplotě do OD_{600nm}=0,7-0,8.
- Přidat IPTG na koncentraci 0,3 mM a nechat indukovat v pokojové teplotě po dobu 3 hodin. Každou hodinu odebírat 1 ml pro analýzu na SDS-PAGE (vzorky T1, T2 a T3).

- Centrifugovat kulturu 15 minut při 4 °C a zrychlení 8000×g.
- Odstranit supernatant a buňky resuspendovat v přibližně 40 ml NudC Tris pufru.
- Přelit resuspendované buňky do 50ml zkumavky a centrifugovat po dobu 10 minut, 4 °C při zrychlení 8000×.
- Odstranit supernatant a buňky zamrazit.

Následná izolace probíhá stejně jako v případě RNA polymerázy *B. subtilis*. Pouze místo fosfátového pufru byl používán NudC Tris pufr. Před samotnou izolací je však dobré analyzovat odebrané kontrolní vzorky na SDS-PAGE:

- Kontrolní vzorky (T0-T4) centrifugovat 10 minut při 5000×g, odsát supernatant a resuspendovat v 500 µl NudC Tris pufru.
- Sonikovat každý vzorek 5×10 vteřin a centrifugovat 15 minut při 12000×g.
- Odebrat supernatant do nových 1,5ml zkumavek (popsat T0s, T1s, T2s, T3s a T4s).
- Pelet resuspendovat v 500 µl NudC Tris pufru (popsat T0p, T1p, T2p, T3p a T4p).
- Kontrolní vzorky analyzovat na SDS-PAGE.

4.7.3 Dialýza

Po izolaci proteinů je následně třeba je přemístit do jejich skladovacích roztoků (NudC uchovávací pufr pro NudC a RNAP uchovávací pufr pro RNA polymerázu *B. subtilis*). K tomu slouží dialýza, kdy se roztok s proteinem vstříkne do dialyzační kazety (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette s kapacitou 3-12 ml a velikostí pórů 3.500 MWCO) s póry tak malými, aby nemohl projít protein, ale pufr ano.

- Spojit frakce (z 4.7.1 nebo 4.7.2), které se zabarvily při orientačním Bradfordově testu.
- Dialyzační kazetu umístit na 2 minuty do dialyzačního pufru (NudC uchovávací pufr nebo RNAP uchovávací pufr).
- Injekční stříkačkou injikovat spojené frakce do dialyzační kazety a následně odsát z dialyzační kazety přebytečný vzduch.
- Umístit kazetu na plastovém plováku do dialyzačního pufru. Pufr s kazetou umístit na magnetickou míchačku v chladové místnosti (4 °C) a nechat míchat minimálně 8 hodin.
- Vyměnit dialyzační pufr a pokračovat v míchání další minimálně 4 hodiny.

- Protein odsát injekční stříkačkou a uchovávat v -20 °C.

4.7.4 Měření koncentrace proteinů

Koncentraci proteinů lze měřit pomocí Bradfordova činidla, které mění barvu v přítomnosti proteinů. Intenzita změny je přímo úměrná koncentraci proteinů, čehož je možné využít měřením absorbance (595 nm) Bradfordova činidla s proteinem o různých známých koncentracích a vytvořením kalibrační křivky. Pak lze změřit absorbanci proteinu o neznámé koncentraci se stejným množstvím Bradfordova činidla a díky vytvořené kalibrační křivce dopočítat koncentraci proteinu.

- Vytvořit kalibrační křivku: do kyvet pro měření absorbance na spektrofotometru napipetovat 1 ml Bradfordova činidla.
- Do jednotlivých kyvet postupně přidávat BSA o koncentraci 0, 1, 3, 5, 10 a 20 µg/ml a důkladně promíchat pipetou.
- Změřit absorbanci při 595 nanometrech a z naměřených hodnot vytvořit přímku.
- Do kyvety s Bradfordovým činidlem přidat vzorek o neznámé koncentraci a změřit absorbanci a s použitím kalibrační přímky vypočítat koncentraci (hodnota naměřené absorbance se musí vejít mezi naměřené hodnoty BSA, jinak může být výsledek nepřesný).

Poznámka: absorbanci všech vzorků je nutné měřit stejně dlouhou dobu po smíchání proteinu s činidlem.

4.7.5 Rekonstituce RNA polymerázy

RNA polymeráza *B. subtilis* byla izolována pouze jako jádro (bez faktoru sigma). Pro její správnou funkci je nutné ji rekonstituovat s jejím faktorem sigma. V tomto případě bylo jádro RNA polymerázy rekonstituováno s primárním faktorem sigma sigA v poměru 1:50 ve prospěch sigA. Směs byla inkubována 30 minut ve 30 °C a poté zamražena v -20 °C pro pozdější použití v transkripčních experimentech

4.7.6 Gelová chromatografie

Gelová chromatografie je metoda využívaná k separaci různě velkých molekul. V tomto konkrétním případě byla využita pro oddělení molekuly NudC od jiných různě velkých proteinů, které mohly být izolovány spolu s NudC.

- Přefiltrovat NudC uchovávací pufr a nechat při pokojové teplotě alespoň 60 minut odvzdušnit.
- Podle návodu u konkrétního přístroje ekvilibrovat kolonu na gelovou chromatografii potřebným množstvím NudC uchovávací pufr.
- Nanést vzorek (ve stejném pufru jako je použit k ekvilibraci) na kolonu a začít separovat.
- Poté, co přístrojem naměřená absorbance překročí práh (prahové množství proteinu ve vzorku), začít odebírat přibližně půlmililitrové frakce do předpřipravených 1,5ml zkumavek.
- Analyzovat frakce pomocí SDS-PAGE, případně sloučit vybrané frakce a změřit výslednou koncentraci proteinu.

4.8 Transkripční experimenty *in vitro*

Nejčastější náplní mé práce byly transkripční experimenty *in vitro*. Transkripce byla prováděna především s komerčně dostupným holoenzymem polymerázy *E. coli* od společnosti New England Biolabs, ale částečně také s vlastnoručně izolovanou polymerázou *B. subtilis*. Jako templát byly použity modifikované plazmidy p770 s různými inzerty. Transkripce byly prováděny buď s radioaktivně značeným [α - ^{32}P]-UTP nebo [^{32}P]-NAD. Protože byla transkripce prováděna s radioaktivním materiálem, bylo třeba dodržovat všechny zásady bezpečnosti práce s radioizotopy.

4.8.1 Protokol transkripčních experimentů *in vitro*

- Připravit master mix pro transkripci:
 - 2,4 μl injekční vody (1,5 μl v případě *NAD)
 - 0,1 μl BSA 10 mg/ml (finální koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$)
 - 0,9 μl KCl 1M (finální koncentrace 90mM)
 - 0,5 μl 20 \times transkripční pufr
 - 1 μl ATP 0,02mM (finální koncentrace 2 μM)
 - 1 μl GTP 1mM (finální koncentrace 100 μM)
 - 1 μl CTP 2mM (finální koncentrace 200 μM)
 - 1 μl UTP 0,1mM (finální koncentrace 10 μM)
 - 0,1 μl [α - ^{32}P]-UTP (18,5 MBq)/ 1 μl [^{32}P]-NAD (37 MBq)

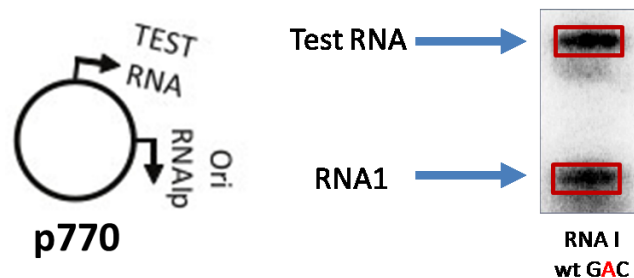
Pro větší počet vzorků úměrně zvýšit objemy.

- D 1,5ml zkumavek napipetovat 1 μ l templátové DNA (plazmid o koncentraci 100 ng/ μ l – finální koncentrace 10 ng/ μ l).
- Do zkumavek s templáty přidat 8 μ l master mixu a zahřát na 37 °C (30 °C v případě polymerázy *B. subtilis*).
- Ke směsi přidat 1 μ l RNA polymerázy 300nM (finální koncentrace 30 nM), vortexovat, stočit a inkubovat v 37 °C (30 °C v případě polymerázy *B. subtilis*) po dobu 15 minut.
- Zastavit reakci přidáním 10 μ l STOP solution (slouží i jako loading dye pro elektroforézu), vortexovat, stočit.
- Polovinu každého vzorku analyzovat na vertikální polyakrylamidové elektroforéze (4.5.2) a druhou polovinu zamrazit na -20 °C pro případné pozdější použití.

4.8.2 Vyhodnocení transkripčních experimentů *in vitro*

Výsledkem transkripčních experimentů *in vitro* je relativní účinnost RNA polymerázy v závislosti na daném promotoru použít NAD⁺ jako iniciační substrát pro transkripci. Vyhodnocení je prováděno denzitometricky programem Quantity One.

Poté, co je transkripční gel nasnímán citlivou deskou a oskenován přístrojem Molecular Imager FX, vyhodnotí se denzita jednotlivých proužků, od kterých je odečtena hodnota pozadí v jejich nejbližším okolí. Každý vzorek vytvoří na gelu 2 proužky: horní proužek (asi 160 nukleotidů dlouhý produkt) je transkript vytvořený nasednutím polymerázy na testovaný promotor, spodní proužek (108 nukleotidů dlouhý produkt) je pak transkript vytvořen nasednutím polymerázy promotor RNA1, který je vlastní plazmidu p770 (obr. 14). Výsledná hodnota transkriptu z testovaného promotoru je pak vydělena hodnotou transkriptu RNA1.



Obr. 14: Výsledek transkripce *in vitro* s radioaktivně značeným UTP. Jako DNA templát byl použit modifikovaný plazmid p770 s endogenní sekvencí pro RNA 1 (Ori RNA1p) a s RNA 1 promotorovou sekvencí vnesenou do MCS (TEST RNA). Hodnoty v červených obdélnících byly vyčísleny v programu Quantity One a vydělením mezi sebou byla získána relativní aktivita testovaného promotoru vztažená k RNA 1 – protože se zde v obou případech jedná o totožný promotor, blíží se hodnota 1.

V případě transkripce s radioaktivně značeným UTP získáme vydělením hodnot relativní sílu testovaného promotoru vztaženou k síle promotoru RNA1 (důležité je, že oba transkripty mají stejný počet uracilů v sekvenci). V případě transkripce s radioaktivně značeným NAD⁺ získáme vydělením hodnot relativní schopnost RNAP na testovaném promotoru využít NAD⁺ jako iniciační substrát vztaženou k schopnosti RNAP využít NAD⁺ jako iniciační substrát na promotoru RNA1.

Nakonec je relativní schopnost využít NAD⁺ jako iniciační substrát vydělena relativní silou promotoru. Tímto získáme poměrnou relativní účinnost inkorporace NAD⁺ (vztaženou k RNA1, RNA1 = 1) nezávislou na síle jednotlivých promotorů, takže je možné porovnávat jednotlivé promotory mezi sebou.

5 Výsledky

5.1 Příprava templátů pro transkripci

Cílem práce je zjistit, jak promotorová sekvence ovlivňuje výběr substrátu pro iniciaci transkripce, konkrétně pak, jak často je jako iniciační substrát vybírán nikotinamid adenin dinukleotid. Aby bylo možné formulovat hypotézu, jakým způsobem promotor ovlivňuje výběr substrátu, bylo nejprve vytvořeno přes 70 modifikovaných promotorových sekvencí (ne všechny výsledky ze všech promotorů jsou v této práci ukázány, protože některé promotory nebyly funkční, nebyly relevantní z hlediska výsledků a formování hypotéz, nebo s danými promotory nebyla prováděna transkripce z jiných důvodů). Tyto sekvence byly vloženy do plazmidu p770. Plazmidy s tímto inzertem pak sloužily jako templáty pro transkripční experimenty *in vitro*. Všechny vytvořené promotory ukazuje [tabulka č. 1](#).

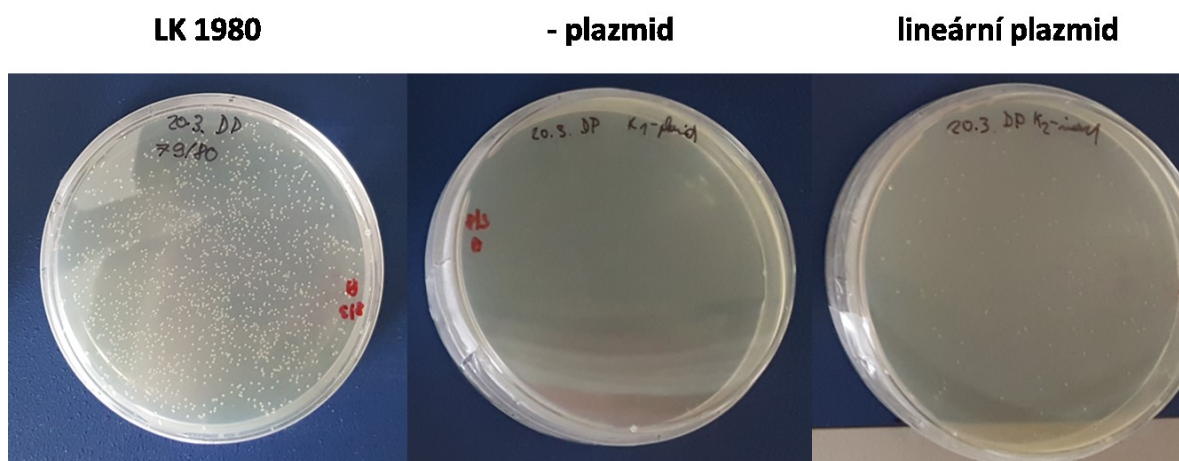
Tabulka č. 1: Přehled všech promotorových sekvencí vytvořených v rámci této práce

| Číslo kmene | Název plazmidu | Sekvence promotoru | Promotor |
|-------------|----------------|---|------------------------|
| LK 1679 | NP 1 | TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTGACAAATAATGTAGTGAGGTGG | Pveg wt |
| LK 1680 | NP 2 | TTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTG | RNA1 wt |
| LK 1681 | NP 3 | TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTGACAAATAATGTACAGTATTTG | Pveg/RNA1 +1 až +10 |
| LK 1682 | NP 4 | TTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGAGTGAGGTGG | RNA1/Pveg +1 až +10 |
| LK 1683 | NP 5 | TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTGACAAATAATGTAGTGAGGTGG | Pveg spacer18 |
| LK 1702 | NP 6 | TTCTTGAAGGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTG | RNA1 spacer17 |
| LK 1700 | NP 7 | TTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTG | RNA1 +1G |
| LK 1701 | NP 8 | CCGTGAGCTTCTACCAGCAAATACCTATAGTGGCGGCACTCCTGAG | GcvB |
| LK 1684 | NP 9 | TGATTGTTTGTTTAAAGCAAAGGCGTAAAGTAGCACCCATAGAGCGAG | CrcC |
| LK 1685 | NP 10 | GTATTGGCAGGATGGTGAGATTGAGCGACAATCGAGTTACACCGTCGC | ChiX |
| LK 1686 | NP 11 | CCCTTGCTTTCTAACGTGAAAGTGGTTTAGGTTAAAAGACATCAGTTGAA | HisL |
| LK 1687 | NP 12 | AAATTGGCAACTAAAGGTAAACCGTTATAACACAGTCCCGGCGCAG | McaS |
| LK 1688 | NP 13 | TTCTGGAGTATGAAACAATCATTCGTATATAAGCTTTATTTGAGGT | RHHH |
| LK 1689 | NP 14 | TACTTGTACTATTTACAAAAACCTATGGTAACTCTTTAGGCATTCCTTCGA | LivL |
| LK 1690 | NP 15 | ACTCTGTTTCATTACCCAGATATGGGTAAATCTTTTAATTACAACTGCG | UspE |
| LK 1691 | NP 16 | CGGTCGTATGGCAAGTTTCATTGGCTGATATAACCTAAAGATCAAGACG | RyfD |
| LK 1715 | NP 25 | TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTGACACTAGAAGGACAGTATTTG | Pveg/RNA1 -10 až +10 |
| LK 1716 | NP 26 | TTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGACAGTATTTG | RNA1/pUC19 |
| LK 1717 | NP 27 | GTCTTGAAGTCATGCGCGGTTAAGGCTAAACTGAAAGGACAGTATTTG | RNA1/Bird |
| LK 1718 | NP 28 | TTCTTGAAGTAGTGGCCCGACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTG | RNA1/EMBO |
| LK 1719 | NP 29 | TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTGACACTAGAAGGAGTGAGGTGG | Pveg/RNA1 -10 až +1 |
| LK 1720 | NP 30 | TTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAAATAATGTACAGTATTTG | RNA1/Pveg -10 až +1 |
| LK 1721 | NP 31 | TTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTATAATGTGTGGATATTGTGAG | RNA1/LacUV5 -10 až +10 |
| LK 1722 | NP 32 | GGCTTTTACACTTTTATGCTTCCGGCTCGTACACTAGAAGGACAGTATTTG | LacUV5/RNA1 -10 až +10 |
| LK 1742 | NP 33 | TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTGATAATGTGTGGAGTGAGGTGG | Pveg/LacUV5 -10 až +1 |
| LK 1743 | NP 34 | TTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGATATTGTGAG | RNA1/LacUV5 +1 až +10 |

| | | | |
|---------|-------|---|------------------------|
| LK 1744 | NP 35 | TAT <u>TTGACA</u> AAAAATGGGCTCGTGTG <u>TACACT</u> AGAAGGAATTATTGTGAG | Pveg/RNA1/LacUV5 |
| LK 1745 | NP 36 | GGC <u>TTGACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TACACT</u> AGAAGGACAGTATTTG | LacUV5/RNA1 -10 až +10 |
| LK 1746 | NP 37 | TAT <u>TTGACA</u> GAAAAATGGGCTCGTGTG <u>TACACT</u> AGAAGGAGTGAGGTGG | Pveg/RNA1 -10 až +1 |
| LK 1747 | NP 38 | TTCT <u>TTGAAG</u> TGGTGGCCTAACTACGGCT <u>TATAAT</u> GTGTGGACAGTATTTG | RNA1/LacUV5 -10 až +1 |
| LK 1748 | NP 39 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TACACT</u> AGAAGGAATTATTGTGAG | LacUV5/RNA1 -10 až +1 |
| LK 1749 | NP 40 | GGC <u>TTGACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTTGC <u>TATAAT</u> GTGTGGATATTGTGAG | LacUV5 -34G ext |
| LK 1750 | NP 41 | GGC <u>TTGACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTTGC <u>TATAAT</u> GTGTGGATATTGTGAG | LacUV5 -34G |
| LK 1751 | NP 42 | GGC <u>TTGACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GGGAGGAATTATTGTGAG | LacUV5 -34G/-3A/-5G |
| LK 1752 | NP 43 | GGC <u>TTGACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GGGAGGAGATTGTGAG | LacUV5 -34G/+2G |
| LK 1753 | NP 44 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGGAGATTGTGAG | LacUV5 +2G |
| LK 1754 | NP 45 | TTCT <u>TTGAAG</u> TGGTGGCCTAACTACGGCT <u>TACACT</u> AGAAGGAGAGTATTTG | RNA1 +2G |
| LK 1755 | NP 46 | TTCT <u>TTGAAG</u> TGGTGGCCTATTTATGTT <u>TACACT</u> AGAAGGACAGTATTTG | RNA1 mut |
| LK 1756 | NP 47 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TACAAT</u> GTGTGGATATTGTGAG | LacUV5 -10C |
| LK 1757 | NP 48 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TACACT</u> GTGTGGATATTGTGAG | LacUV5/-10RNA1 |
| LK 1758 | NP 49 | GGC <u>TTGACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TACACT</u> GTGTGGATATTGTGAG | LacUV5/-10RNA1 -34G |
| LK 1759 | NP 50 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGGAGTGAGGTGG | LacUV5/Pveg +1 až +10 |
| LK 1798 | NP 51 | TAT <u>TTGACA</u> AAAAATGGGCTCGTGTG <u>TACACT</u> AGAAGGAGTGAGGTGG | Pveg/RNA1 -10 až +1 |
| LK 1804 | NP 52 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGGATATTGTGAG | LacUV5 wt |
| LK 1805 | NP 53 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGAAGATTGTGAG | LacUV5 AAG |
| LK 1806 | NP 54 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGATATTGTGAG | LacUV5 TAT |
| LK 1807 | NP 55 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGGACATTGTGAG | LacUV5 GAC |
| LK 1808 | NP 56 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGGAATTGTGAG | LacUV5 GAA |
| LK 1809 | NP 57 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGTAATTGTGAG | LacUV5 TAA |
| LK 1810 | NP 58 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGAGATTGTGAG | LacUV5 TAG |
| LK 1811 | NP 59 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGTACATTGTGAG | LacUV5 TAC |
| LK 1812 | NP 60 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGCAATTGTGAG | LacUV5 CAT |
| LK 1813 | NP 61 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGCAATTGTGAG | LacUV5 CAA |
| LK 1814 | NP 62 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGCAATTGTGAG | LacUV5 CAG |
| LK 1815 | NP 63 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGCAATTGTGAG | LacUV5 CAC |
| LK 1816 | NP 64 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGAATATTGTGAG | LacUV5 AAT |
| LK 1817 | NP 65 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGAATTATTGTGAG | LacUV5 AAA |
| LK 1818 | NP 66 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGAACATTGTGAG | LacUV5 AAC |
| LK 1824 | NP 67 | GGC <u>TTTACA</u> CTTTATGCTTCCGGCTCGT <u>TATAAT</u> GTGTGGAATTGTGAGC | LacUV5 GAA |
| LK 1825 | NP 68 | TTCT <u>TTGAAG</u> TGGTGGCCTAACTACGGCT <u>TACACT</u> AGAAGGAATTGTGAGC | RNA1/lacUV5 GAA |
| LK 1826 | NP 69 | TAT <u>TTGACA</u> AAAAATGGGCTCGTGTG <u>TACAAT</u> AAATGTAATTGTGAGC | Pveg/LacUV5 TAA |
| LK 1898 | NP 70 | TTCT <u>TTGAAG</u> TGGTGGCCTAACTACGGCT <u>TACACT</u> AGAAGGACAGTATTTG | RNA1 -1C |
| LK 1899 | NP 71 | TAT <u>TTGACA</u> AAAAATGGGCTCGTGTG <u>TACACT</u> AGAAGCAGTGAGGTGG | RNA1/Pveg CAG |
| LK 1900 | NP 72 | TAT <u>TTGACA</u> AAAAATGGGCTCGTGTG <u>TACACT</u> AGAAGCAGTGAGGTGG | RNA1/Pveg CAC |
| LK 1981 | DP 1 | TTCT <u>TTGAAG</u> TGGTGGCCTAACTACGGCT <u>TACACT</u> AGAAGGAAGTATTTG | RNA1 GAA |
| LK 1982 | DP 2 | TTCT <u>TTGAAG</u> TGGTGGCCTAACTACGGCT <u>TACACT</u> AGAAGTAGAGTATTTG | RNA1 TAG |
| LK 1983 | DP 3 | TAT <u>TTGACA</u> AAAAATGGGCTCGTGTG <u>TACAAT</u> AAATGGAGTGAGGTGG | Pveg GAC |
| LK 1985 | DP 4 | TAT <u>TTGACA</u> AAAAATGGGCTCGTGTG <u>TACAAT</u> AAATGGAGTGAGGTGG | Pveg GAG |
| LK 1986 | DP 5 | TAT <u>TTGACA</u> AAAAATGGGCTCGTGTG <u>TACAAT</u> AAATGGAGTGAGGTGG | Pveg CAC |
| LK 1987 | DP 6 | TAT <u>TTGACA</u> AAAAATGGGCTCGTGTG <u>TACAAT</u> AAATGGAGTGAGGTGG | Pveg GAA |
| LK 1973 | DP 7 | AAATTTCTCT <u>TTGTCA</u> GGCCGGAATAACTCCC <u>TATAAT</u> GCGCCACCACTGACACGG | rrnB P1 wt |
| LK 1974 | DP 8 | AAATTTCTCT <u>TTGTCA</u> GGCCGGAATAACTCCC <u>TATAAT</u> GCGCCACTAGTGACACGG | rrnB P1 TAG |
| LK 1975 | DP 9 | AAATTTCTCT <u>TTGTCA</u> GGCCGGAATAACTCCC <u>TATAAT</u> GCGCCACCACTGACACGG | rrnB P1 GAC |
| LK 1976 | DP 10 | AAATTTCTCT <u>TTGTCA</u> GGCCGGAATAACTCCC <u>TATAAT</u> GCGCCACCAATGACACGG | rrnBP1 GAA |
| LK 1980 | DP 11 | AAATTTCTCT <u>TTGTCA</u> GGCCGGAATAACTCCC <u>TATAAT</u> GCGCCACCAAGTGACACGG | rrnB P1 GAG |

5.1.1 Transformace

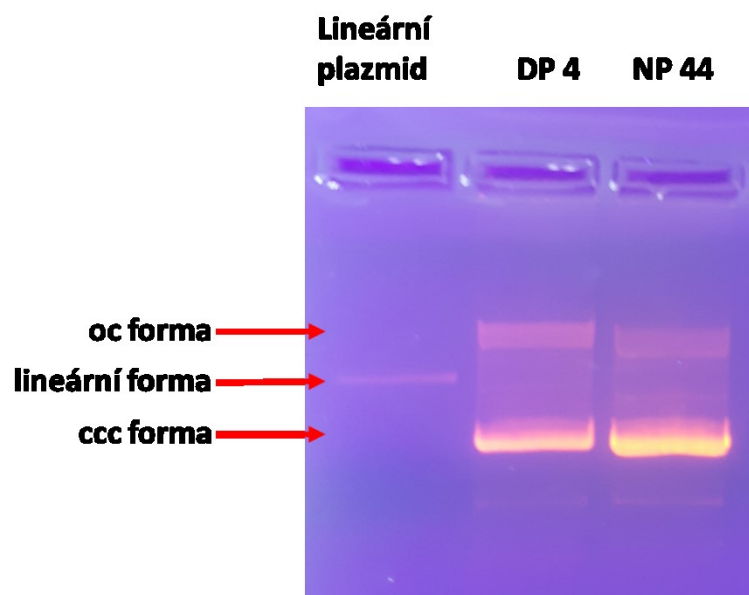
Promotorové sekvence byly ligovány do plazmidu p770 a ligační směsi byly transformovány do *E. coli* DH5α ([obr. 15](#)). Vybraná kolonie z každé transformace (případně více kolonií) byla dána na sekvenaci a BLASTem (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) porovnána s předpokládanou sekvencí. V případě 100% shody byly buňky ze sekvenované kolonie namnoženy, zakonzervovány a zapsány do katalogu ([tabulka č. 1](#)).



Obr. 15: Výsledek transformace plazmidu do kmene *E. coli* LK 1980. Na první misce jsou vyšetřeny transformované bakterie LK 1980. Na druhé misce jsou vyšetřeny buňky, které byly podrobeny transformaci bez přidání plazmidu. Kvůli absenci rezistence k ampicilinu a přítomnosti ampicilinu na misce nevyrostla jediná kolonie. Na třetí misce jsou vyšetřeny buňky, ke kterým byla při transformaci přidána ligační směs bez inzertu. Těchto buněk vyrostla asi desetina oproti první misce, což znamená, že asi 10 % kolonií na první misce je bez inzertu. Proto je dobré pro ušetření času dělat sekvenaci vždy alespoň ze dvou kolonií pro minimalizaci rizika výběru kolonie bez inzertu. Obdobných výsledků bylo dosaženo při transformaci všech kmenů z [tabulky č. 1](#).

5.1.2 Izolace plazmidů

Z konzerv, případně přímo z transformačních misek, byly nechány narůst příslušné bakteriální kultury z [tabulky č. 1](#), ze kterých byly pomocí kitu Wizard Plus Midiprep DNA Purification Systém od společnosti PROMEGA izolovány plazmidy. Ty byly následně přečištěny fenol-chloroformovou extrakcí a jejich koncentrace a čistota zkontrolována na přístroji nanodrop a elektroforeticky na agarózovém gelu ([obr. 16](#)). Na nanodropu byla zkontrolována kontaminace proteiny vypočítáním podílů absorbance při vlnové délce 260 nm a při vlnové délce 280 nm. Přípustné byly hodnoty přes 1,8.



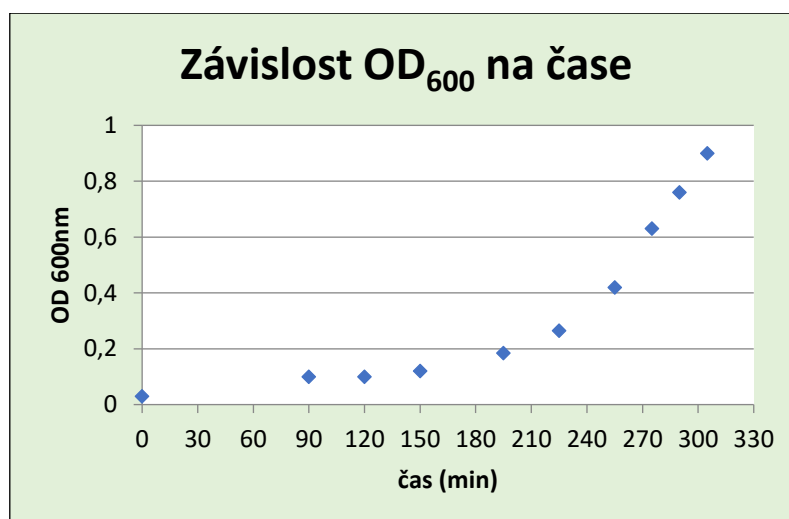
Obr. 16: Izolované plazmidy DP4, NP44 a linearizovaný plazmid na agarózovém gelu. Na gelu je vidět požadovaná forma uzavřeného kruhu (ccc), dále jsou pak patrné nechtěné formy lineární a otevřený kruh (oc). Ze zkušenosti lze říci, že lineární a oc forma v menším měřítku nevadí a nelze se jich úplně zbavit. Na gelu nejsou patrné žádné větší známky znečištění ani degradace. Pokud vypadaly izolované plazmidy (všechny z [tabulky č. 1](#)) na gelu takto, jejich koncentrace byla alespoň 100 ng/μl a hodnota $A_{260/280}$ (indikátor kontaminace proteiny) byla v rozmezí 1,8 – 2,0, byly dále použity v transkripčních experimentech. V opačném případě byly přečištěny, nebo izolovány znovu.

5.2 Izolace proteinů

5.2.1 Výsledek izolace RNA polymerázy *B. subtilis*

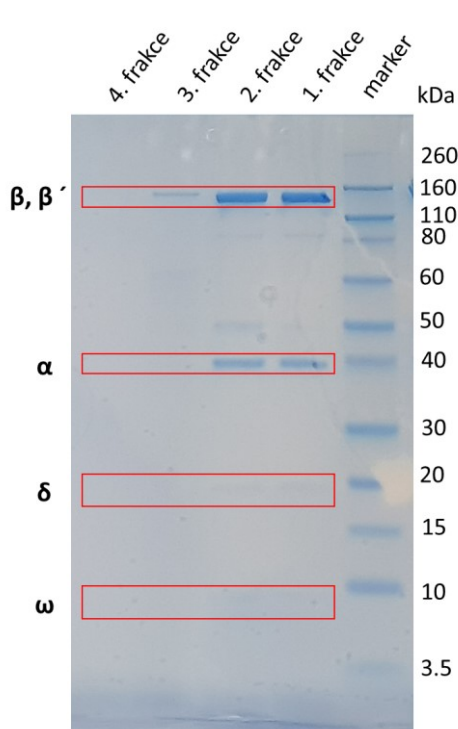
Jádro RNAP bylo izolováno z kmene *B. subtilis* MH5636 (kmen označen **LK 1723**), který byl naší laboratoří získán od (Qi a Hulett 1998) a používán již řadu let. Existují i některé kmeny *E. coli* exprimující polymerázu z *B. subtilis* (Yang a Lewis 2008), nicméně tato polymeráza je těžko izolovatelná a není zcela funkční (L. Krásný, osobní sdělení). V naší laboratoři v současné době běží projekt na přípravu kmene *E. coli*, ze kterého bude možné RNAP z *B. subtilis* bez problémů izolovat a použít.

Kultura *B. subtilis* MH5636 byla zaočkována do 1 litru LB média bez antibiotika. Polymeráza je kódována v chromozomu, takže není třeba antibiotika k udržení plazmidu v buňce. Kultura byla nechána narůst na $OD_{600}=0,9$ (obr. 17).



Obr. 17: Růstová křivka bakteriální kultury kmene *B. subtilis* MH5636. Kultura byla zaočkována do 1 litru LB média bez antibiotika na $OD_{600}=0,03$. Delší lag fáze byla nejspíše způsobena dobou růstu noční kultury použité k zaočkování (přes 14 hodin). Výsledná hodnota OD_{600} byla 0,9 po 305 minutách.

Z narostlé kultury byla izolována RNA polymeráza (podle protokolu 4.7.1) metodou afinitní chromatografie. To bylo umožněno přítomností histidinové kotvy na β' podjednotce RNAP, která má vysokou afinitu ke kovovým iontům. Izolovaný protein byl analyzován na SDS-PAGE (obr. 18).



Obr. 18: Gel z SDS-PAGE s proteinovým markerem a čtyřmi frakcemi získanými z afinitní chromatografie.

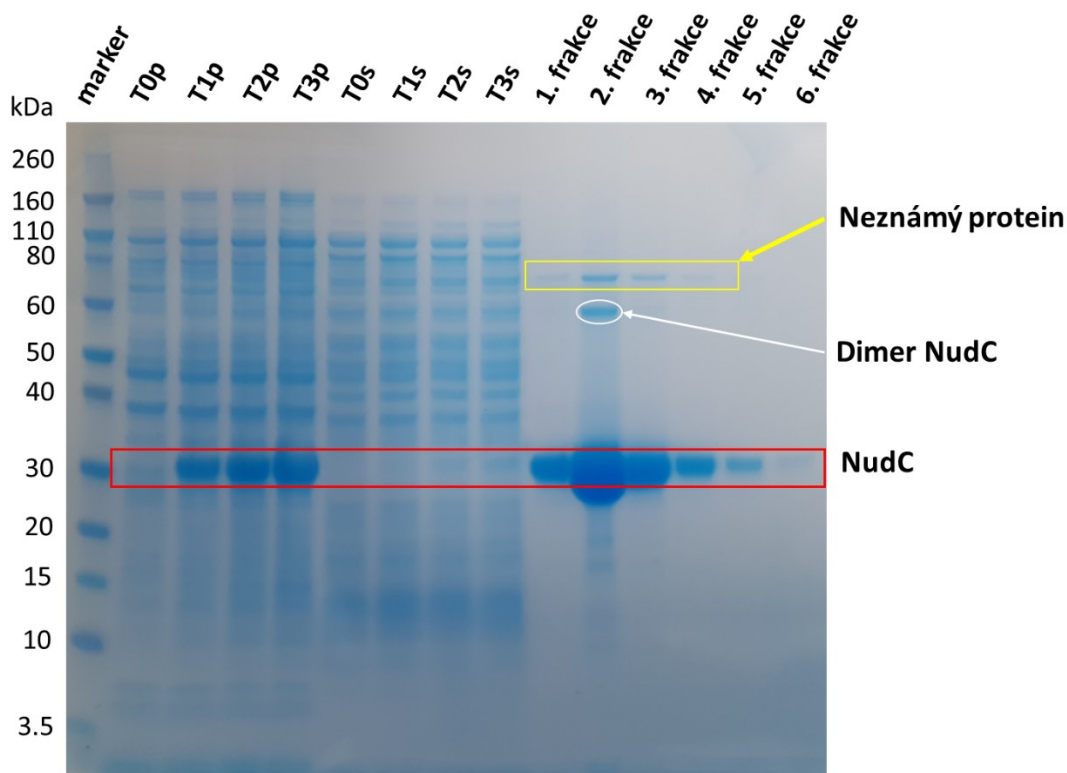
Na gelu jsou vidět proužky o velikosti 133 kDa, jímž odpovídají podjednotky β a β' , 35 kDa náležící podjednotkám α , dále slabě viditelné proužky o velikosti 20 kDa a 8 kDa, které patří podjednotkám δ a ω . V prvních dvou frakcích bylo možné jednoduše vizuálně detekovat přítomnost polymerázy. Ve třetí frakci byla koncentrace proteinů viditelně nižší a ve čtvrté frakci již nebylo možno detekovat ani β podjednotky.

Na základě analýzy na SDS-PAGE byly sloučeny první dvě eluované frakce, dialyzovány do RNAP uchovávacího pufru, a pomocí spektrofotometru a Bradfordova činidla byla určena koncentrace jako 3,45 μM . Polymeráza byla zředěna na koncentraci 300 nM a rekonstituována s padesátinásobným množstvím (15.000 nM) podjednotky SigA. Takto připravený enzym je uchováván v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a je možné ho použít k transkripčním experimentům.

5.2.2 Výsledek izolace enzymu NudC

Gen pro NudC, enzym odstraňující nikotinamidovou čepičku z 5' konce RNA, byl naší laboratoří obdržen od (Bird et al., 2016) zaklonovaný v expresním vektoru pET28a(+) od firmy NOVAGEN. Tento plazmid byl transformován do expresního kmenu *E. coli* BL21 (DE3) (označen jako **LK 1827**). K enzymu je připojena histidinová kotva, která umožňuje snadnou izolaci pomocí afinitní chromatografie.

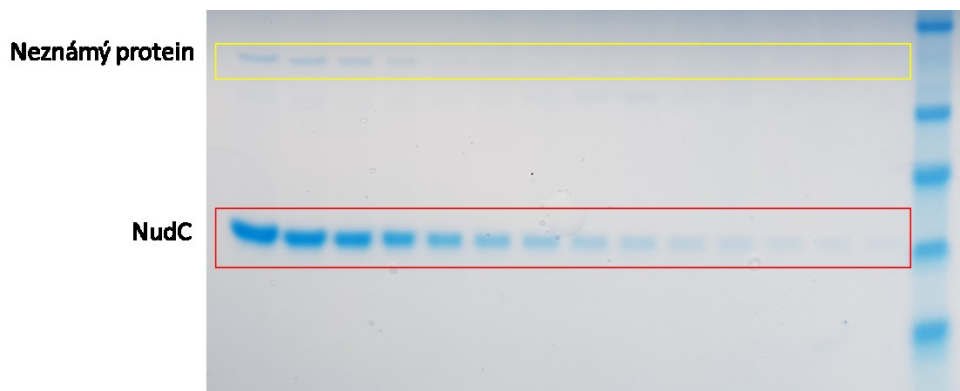
Izolaci proteinu NudC bylo nutné optimalizovat. Při prvním pokusu se nepovedlo izolovat funkční protein, pravděpodobně kvůli použitému pufru – byl použit stejný fosfátový pufr jako při izolaci RNAP *B. subtilis*. Při následné izolaci byl použit NudC Tris pufr podle (Winz et al., 2017). Zde ukazují výsledky pouze druhé, úspěšné izolace (Obr. 19). Optimalizovaný protokol je v kapitole 4.7.2.



Obr. 19: 7% polyakrylamidový gel z SDS-PAGE s enzymem NudC (30 kDa). Na obrázku (zleva) je marker, kontrolní vzorek z peletu odebraný před indukcí IPTG (T0p), kontrolní vzorky z peletu odebrané jednu, dvě a tři hodiny po indukci IPTG, kontrolní vzorek ze supernatantu odebraný před indukcí IPTG, kontrolní vzorky ze supernatantu odebrané jednu, dvě a tři hodiny po indukci IPTG, a nakonec jednotlivé frakce izolovaného proteinu, získané elucí z kolony na afinitní chromatografii. Kontrolní vzorky ukazují, jak se protein expimoval v čase. Ve vzorcích T0p-T3p je protein, který zůstal po sonikaci v peletu, a tudíž je použitou metodou z 4.7.2 neizolovatelný. Vzorky T0s-T3s pak ukazují protein v supernatantu, který byl následně izolován. V jednotlivých eluovaných frakcích (1.-6. frakce) lze vidět purifikovaný NudC a drobnou kontaminaci neznámým proteinem. Ve 2. frakci je také možno vidět proužek, který velikostně odpovídá dimeru NudC (pozn.: NudC za fyziologických podmínek tvoří dimer, analýza byla však prováděna při denaturačních podmínkách).

Frakce 1-5 z [obrázku 19](#) byly sloučeny a dialyzovány do NudC uchovávacího pufru. Frakce 6 byla z důvodu nízké koncentrace proteinu vyloučena, aby příliš neředila výsledný roztok s enzymem. Pomocí Bradfordova činidla a spektrofotometru byla stanovena koncentrace jako 57 μ M.

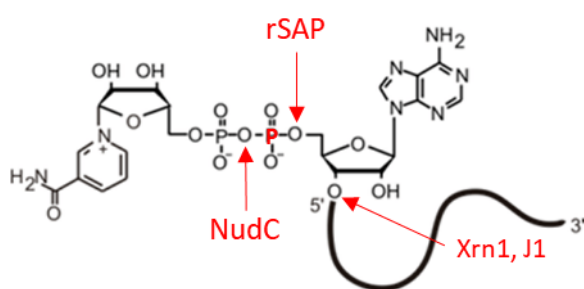
Vzhledem k nepatrné kontaminaci neznámým proteinem byla malá část izolovaného proteinu NudC odebrána a přečištěna metodou gelové chromatografie ([obr. 20](#)), která odděluje proteiny na základě jejich velikosti. Kontaminující protein se však nepodařilo odstranit v dostatečné míře, proto tato přečištěná část nebyla dále používána.



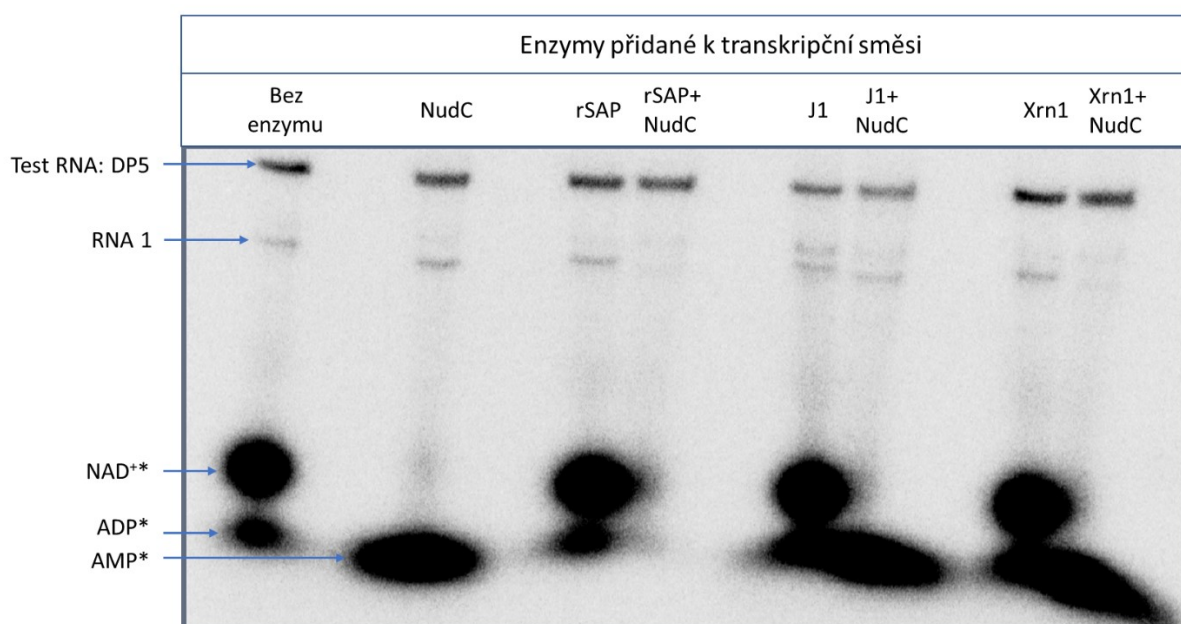
Obr. 20: Gel z SDS-PAGE s NudC po gelové chromatografii. Na gelu lze vidět jak nudC, tak kontaminující protein, který se nepodařilo touto metodou odstranit.

5.2.3 Ověření aktivity enzymu NudC

Aktivita enzymu NudC byla testována na transkriptu s radioaktivně značeným NAD^+ na 5' konci. Transkripční směs po ukončení transkripce (podle 4.8.1) byla místo STOP solution inaktivována teplem (70°C , 15 minut). K této směsi byl přidán NEBuffer 3, enzym NudC ($5,7\mu\text{M}$) a jeden další enzym (specifikováno níže), který odstraní radioaktivní fosfát z 5' konce (NudC totiž rozštěpí NAD^+ na NMN a AMP, přičemž na 5' konci RNA vlákna nechá radioaktivně značený fosfát). Reakční směs byla zahřáta na 37°C po dobu 60 minut. Reakce byla zastavena přidáním STOP solution a analyzována (podle 4.5.2) na polyakrylamidovém gelu (obr. 22). Pro odstranění radioaktivně značeného fosforu byly použity proteiny rSAP (NEB), J1 (izolován v naší laboratoři) a Xrn1 (NEB). Enzym rSAP je rekombinantní alkalická fosfatáza z krevet, odstraňující fosfát z 5' konce RNA (odstraňuje fosfáty i z volných nukleotidů, Olsen et al., 1991). J1 je RNA $5' \rightarrow 3'$ exonukleáza z bakterie *B. subtilis* (Mathy et al., 2007). Xrn1 je kvasinková exonukleáza, která pro svou aktivitu vyžaduje monofosfát na 5' konci (Stevens 1980). Místa štěpení jednotlivých enzymů jsou ukázána na následujícím schématu (obr. 21).



Obr. 21: Místa štěpení enzymů NudC, rSAP, Xrn1 a J1. NudC odštěpí z NAD^+ NMN a nechá na 5' konci AMP. Alkalická fosfatáza (rSAP) z takovéto RNA dokáže odštěpit radioaktivní fosfát a RNázy Xrn1 a J1 umí RNA s monofosfátem na 5' konci degradovat. Červeně je znázorněn radioaktivní izotop ^{32}P .



Obr. 22: 7% polyakrylamidový gel z transkripce s NAD⁺* pro kontrolu aktivity NudC. Jako templát pro transkripci posloužil izolovaný plazmid z kmene LK 1986, který obsahuje endogenní promotor pro RNA1 a zaklonovaný promotor DP5 (tabulka č. 1). Pokud byl k transkriptu přidán pouze enzym NudC, tak nebylo možné pozorovat změnu v intenzitě proužků na gelu, protože radioaktivně značený fosfor byl stále přítomný na 5' konci RNA (je však možno pozorovat posun proužku volného NAD⁺*, které bylo rozštěpeno na NMN a AMP*). Po přidání rSAP a Xrn1 zmizel proužek RNA1 (z 85 %) – v případě rSAP byl odstraněn radioaktivní fosfát a v případě Xrn1 byla degradována RNA bez nikotinamidové čepičky na 5' konci. Proužek „Test RNA“ nezmizel (pouze částečně ztratil na intenzitě, asi 20 %) pravděpodobně kvůli sekundární struktuře RNA (viz diskuze).

5.3 Transkripční experimenty

Cílem transkripčních experimentů bylo zjistit, jestli a případně jak ovlivňuje sekvence promotoru výběr NAD⁺ RNA polymerázou jako substrátu pro iniciaci transkripce. Transkripční experimenty jsou zde rozděleny chronologicky na 3 fáze podle toho, co bylo konkrétním cílem daného pokusu. Na základě výsledků z každé fáze byla vytvořena hypotéza a byly navrženy promotory pro ověření a zpřesnění této hypotézy ve fázi následující. Všechny pokusy byly prováděny minimálně v triplicátech a výsledky zprůměrovány.

5.3.1 1. fáze transkripčních experimentů *in vitro*

Experimenty v této fázi byly z větší části prováděny doktorkou Natálií Panovou, nicméně jejich výsledky jsou důležité pro pochopení designu experimentů v dalších fázích a části experimentů jsem se také účastnil. V 1. fázi transkripčních experimentů bylo cílem zjistit, zdali má sekvence promotoru na výběr NAD⁺ jako substrátu pro iniciaci transkripce vůbec nějaký vliv, případně která část promotoru je při výběru NAD⁺ jako iniciačního substrátu nejdůležitější. Proto byly připraveny templáty pro transkripci ze tří různých promotorů a jejich chimér – RNA1, Pveg a lacUV5 (promotory NP1-NP39, [tabulka č. 1](#)). Zde ukazují pouze výsledky z 6 promotorů ([tabulka č. 2](#)).

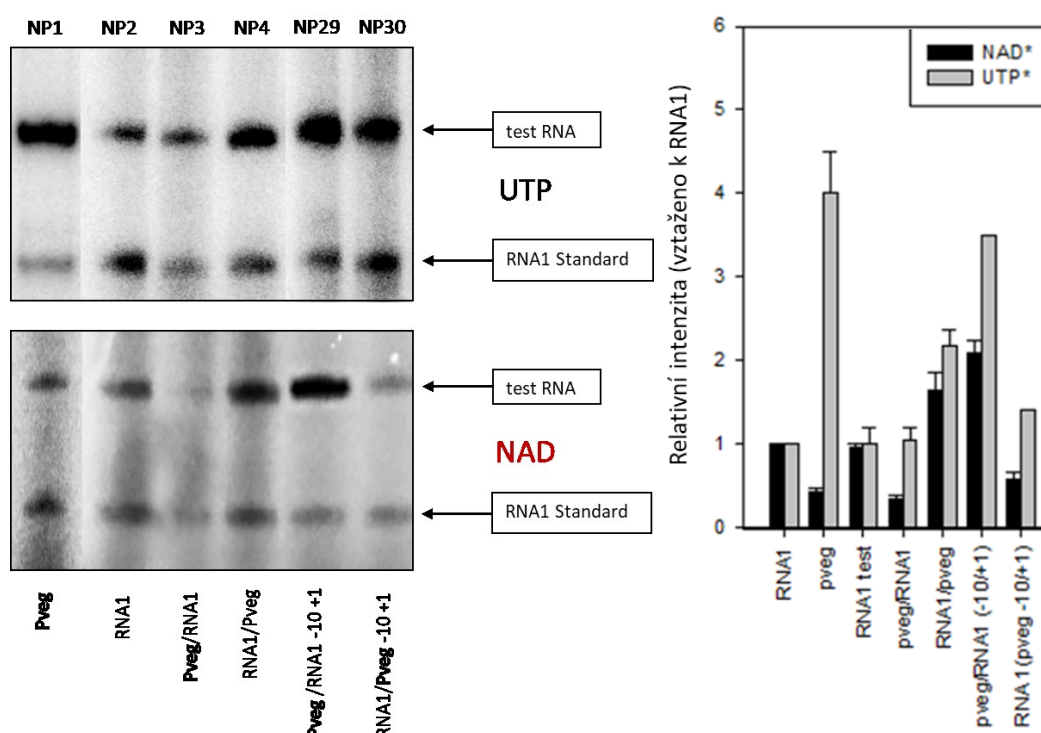
Tabulka č. 2: Sekvence promotorů NP1, NP2, NP3, NP4, NP29 a NP30

| Promotor | Název | Sekvence |
|------------|-------|---|
| Pveg wt | NP1 | TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTGACAAATAAATGTAGTGAGGTGG |
| RNA1 wt | NP2 | TTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTG |
| Pveg/ RNA1 | NP3 | TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTGACAAATAAATGTACAGTATTTG |
| RNA1/ Pveg | NP4 | TTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGAGTGAGGTGG |
| Pveg/ RNA1 | NP29 | TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTGACACTAGAAGGAGTGAGGTGG |
| RNA1/ Pveg | NP30 | TTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAATAAATGTACAGTATTTG |

Jako první byla provedena transkripce *in vitro* se všemi templáty s UTP značeným na α fosfátu radioaktivním izotopem fosforu ³²P. Výsledky transkripce byly puštěny na vertikální polyakrylamidový gel ([obr. 23](#)) a analyzovány na přístroji Bio-Rad Molecular Imager FX programem Quantity One. Výsledkem byly dva proužky pro každý templát – horní proužek o velikosti přibližně 160 nukleotidů patřící promotorové sekvenci uměle vnesené do plazmidu p770 a spodní proužek o velikosti 108 nukleotidů patřící RNA1, která je vlastní plazmidu p770. Oba transkripty mají v sekvenci stejný počet uracilů, takže vydělením intenzit obou proužků byla získána relativní síla testovaného promotoru vztažená k síle promotoru RNA1 ([obr. 23](#)).

Po stanovení relativní síly jednotlivých promotorů byla provedena transkripce *in vitro* s NAD⁺ značeným na α fosfátu radioaktivním izotopem fosforu ³²P. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno obdobně jako v případě transkripce se značený UTP (obr. 23). Výsledná hodnota pak byla vydělena relativní silou promotoru, čímž byla získána relativní účinnost (RU) využití NAD⁺ RNA polymerázou jako substrátu pro iniciaci transkripce na daném promotoru (obr. 33). Tato normalizace tedy zahrnovala změnu promotorové aktivity jako takové. Pokud by tedy RNA polymeráza využívala NAD⁺ jako substrát pro iniciaci transkripce na promotoru RNA1 ve 20 % případů, hodnota 1 RU by znamenala, že RNA polymeráza využívá NAD⁺ jako substrát pro iniciaci transkripce na daném promotoru ve 20 % případů, stejně jako v případě RNA1 (konkrétní účinnost však neznáme, proto je RNA1 využíván jako referenční promotor). Hodnoty RU vyšší než 1 znamenají větší účinnost daného promotoru při využití NAD⁺ jako substrátu pro iniciaci transkripce než RNA1, nižší hodnoty naopak znamenají účinnost menší.

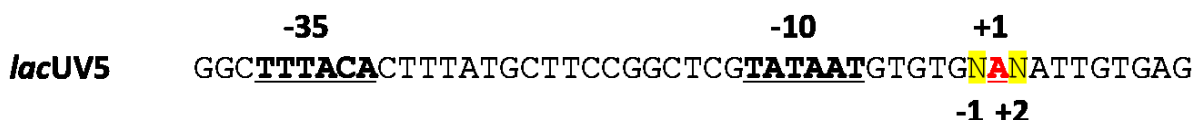
$$RU = \frac{TEST\ RNA\ (UTP^*)/RNA1\ (UTP^*)}{TEST\ RNA\ (NAD^*)/RNA1\ (NAD^*)}$$



Obr. 23: Výsledky transkripce *in vitro* s radioaktivně značeným UTP a NAD⁺. Na levém obrázku je polyakrylamidový gel s výsledky transkripce z promotorů NP1, NP2, NP3, NP4, NP29 a NP30 (celé sekvence viz tabulka č. 1). Na pravém obrázku je graf s kvantifikovanými výsledky z gelu (relativní intenzita jednotlivých proužků vztahená k intenzitě proužku RNA1) – černě jsou výsledky s radioaktivně značeným NAD⁺, šedě pak výsledky s radioaktivně značeným UTP (data získána a obrázek vypracován ve spolupráci s doktorkou Panovou).

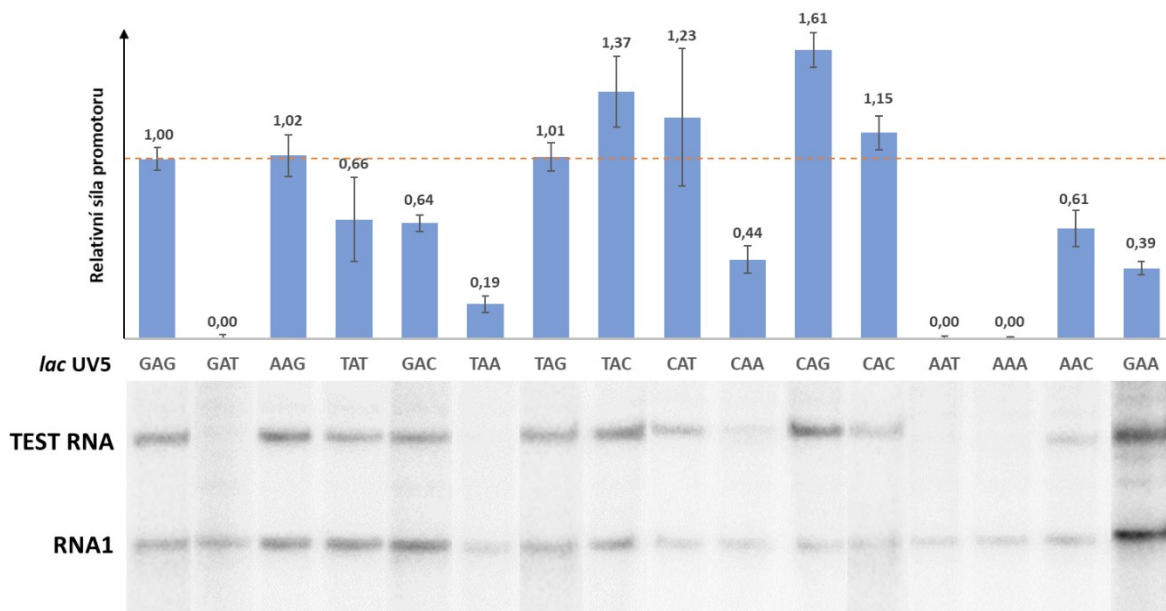
5.3.2 2. fáze transkripčních experimentů *in vitro*

Výsledky z 1. fáze transkripčních experimentů naznačily, že důležitou roli při výběru NAD⁺ jako iniciačního substrátu hrají nukleotidy na pozicích -1 a +2. Další fáze měla tedy za cíl zjistit, které z nukleotidů na této pozici a jak přispívají k přítomnosti NAD⁺ na 5' konci RNA. K tomu byl použit promotor *lacUV5* se všemi 16 kombinacemi nukleotidů na pozicích -1 a +2 (NP44, NP52-55, NP57-67, [obr. 24](#)).



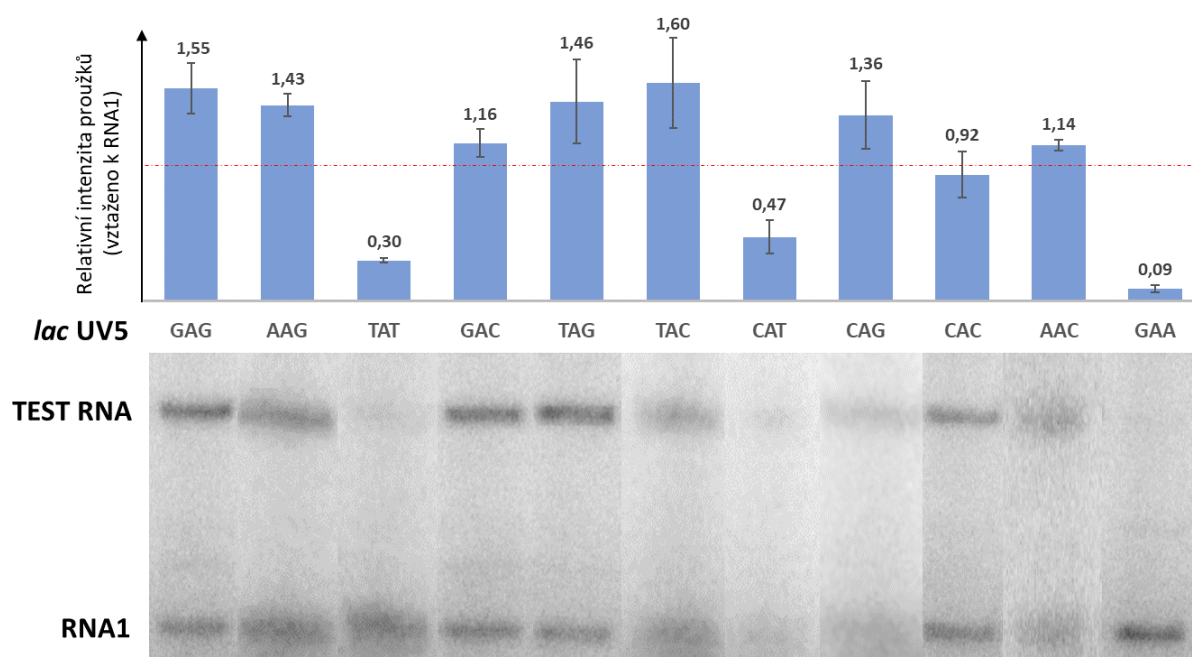
Obr. 24: Sekvence promotoru lacUV5. Jsou vyznačeny oblasti -35 a -10, dále pak iniciační nukleotid +1 a nukleotidy na pozicích -1 a +2. Bylo vytvořeno 16 promotorů se všemi možnými kombinacemi nukleotidů na pozicích -1 a +2.

Nejprve byla se všemi 16 variacemi promotoru *lacUV5* provedena transkripce *in vitro* s radioaktivně značeným UTP pro ustanovení síly jednotlivých promotorů. Výsledky těchto experimentů jsou ukázány na následujícím obrázku (obr. 25).



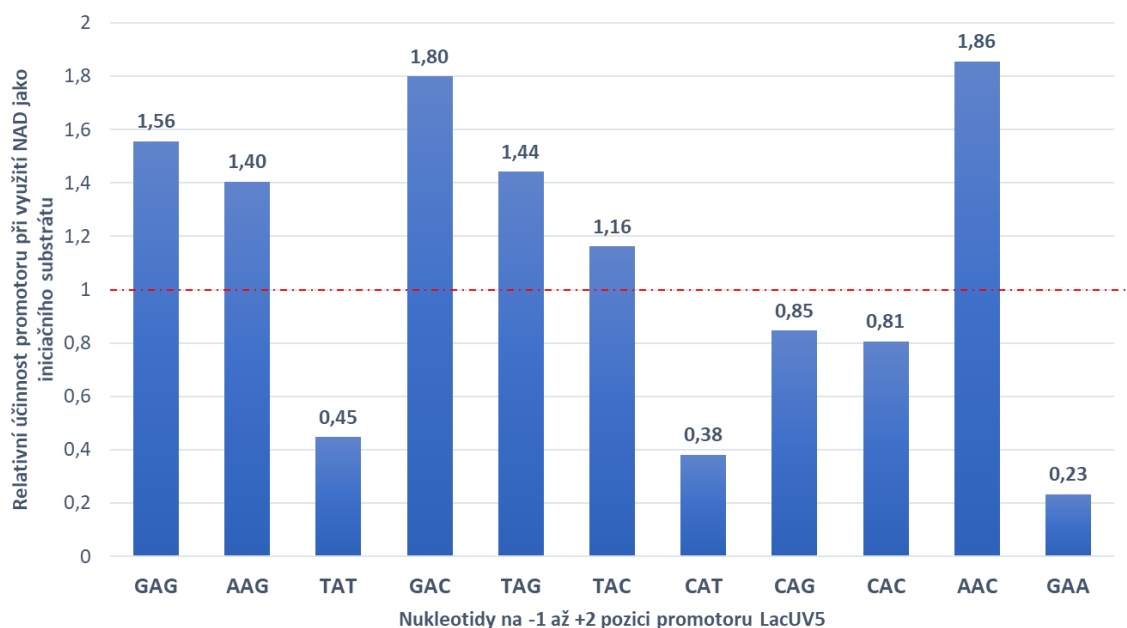
Obr. 25: Transkripce in vitro s radioaktivně značeným UTP. Horní proužky („TEST RNA“) reprezentují transkript z promotoru lacUV5 s danou variací nukleotidů na pozicích -1 až +2. Spodní proužky („RNA1“) reprezentují transkript z promotoru RNA1 (endogenní promotor plazmidu p770). Graf nad gelem ukazuje hodnotu „TEST RNA“ vydělenou hodnotou „RNA1“, což je relativní síla daného lacUV5 promotoru vztažená k síle promotoru RNA1. Pozn.: obrázek je složen z několika gelů.

Po vyhodnocení výsledků transkripce s radioaktivně značeným UTP, která měla za cíl určit relativní sílu jednotlivých promotorů, byla provedena transkripce s radioaktivně značeným NAD⁺. Z těchto experimentů byly vyloučeny některé nefunkční (GAT, AAT, AAA), anebo velice slabé (TAA, CAA) promotory. Výsledky této transkripce shrnuje následující obrázek ([obr. 26](#)).



Obr. 26: Transkripce in vitro s radioaktivně značeným NAD⁺. Horní proužky („TEST RNA“) reprezentují transkript z promotoru lacUV5 s danou variací nukleotidů na pozicích -1 až +2. Spodní proužky („RNA1“) reprezentují transkript z promotoru RNA1 (endogenní promotor plazmidu p770). Graf nad gelem ukazuje hodnotu „TEST RNA“ vydělenou hodnotou „RNA1“ – výsledná hodnota ukazuje kolikrát více či méně má testovaná RNA na svém 5' konci NAD⁺ oproti RNA1. Pozn.: obrázek je složen z několika gelů.

Ze získaných dat (transkripce s NAD⁺ a s UTP) byla stanovena relativní účinnost jednotlivých promotorů při využití NAD⁺ jako substrátu pro iniciaci transkripce ([obr. 27](#)).



Obr. 27: Vliv jednotlivých kombinací nukleotidů na pozicích -1 až +2 promotoru *lacUV5* na účinnost tohoto promotoru při využití NAD^+ jako substrátu při iniciaci transkripce (vztaženo k účinnosti promotoru *RNA1*).

Výsledky 2. fáze transkripčních experimentů *in vitro* přinesly odpověď na otázku významu jednotlivých nukleotidů na pozicích -1 a +2 při výběru substrátu pro iniciaci transkripce RNA polymerázou u promotoru *lac UV5*. Také však přinesly otázku, jakou roli má při výběru substrátu zbytek promotoru.

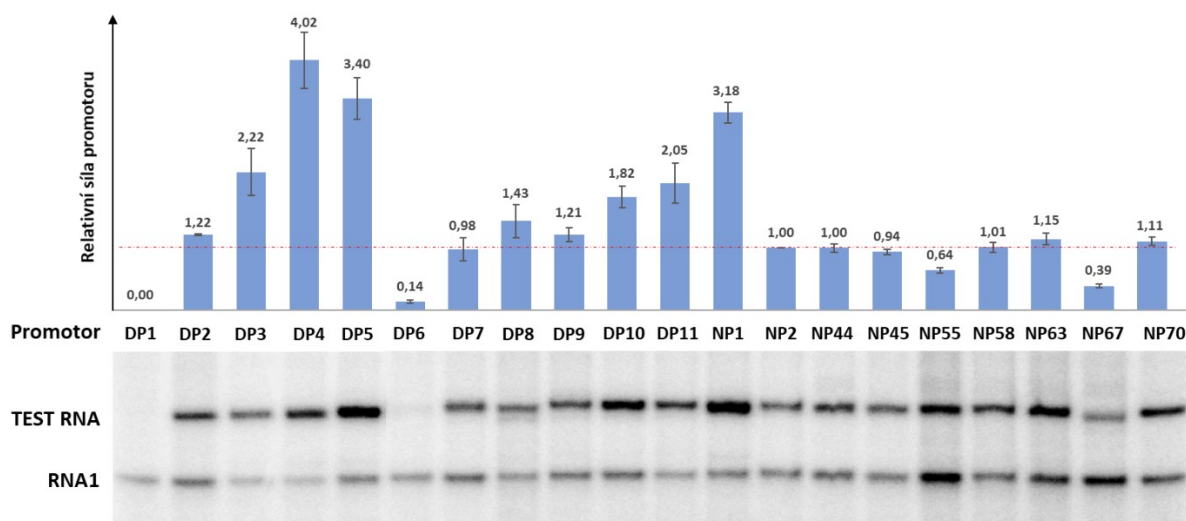
5.3.3 3. fáze transkripčních experimentů *in vitro*

Na základě výsledků z předešlé fáze transkripčních experimentů jsem stanovil hypotézu, že míra inkorporace NAD^+ na 5' konec RNA je závislá bezpochyby na nukleotidech na pozicích -1 a +2. Nebylo ale jasné, jaký vliv má na výběr iniciačního substrátu zbytek promotoru. Proto jsem připravil 4 různé promotory, každý s 5 kombinacemi nukleotidů na pozicích -1 a +2 (sekvence promotorů ukazuje [tabulka č. 3](#)), abych tuto hypotézu ověřil. Konkrétně se jedná o tyto kombinace nukleotidů na pozicích -1, +1 a +2: GAA (*lac UV5 wt*), GAC (*RNA1 wt*), TAG (*Pveg wt*), CAC (*rrnB P1 wt*) a GAG.

Tabulka. č. 3: Sekvence promotorů pro 3. fázi transkripčních experimentů

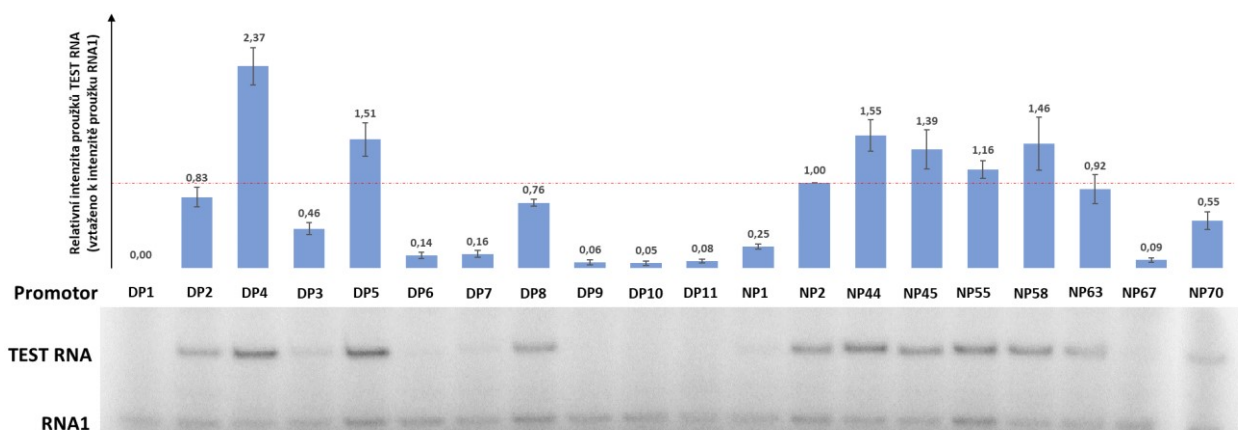
| Název | Promotor | -1 až +2 | Sekvence |
|-------|----------------|----------|---|
| NP67 | <i>lacUV5</i> | GAA | GGC TTTAC ACTTTATGCTTCCGGCTCG TATAAT GTGTG GAA TTGTGAGC |
| NP44 | <i>lacUV5</i> | GAG | GGC TTTAC ACTTTATGCTTCCGGCTCG TATAAT GTGTG GAG ATTGTGAG |
| NP55 | <i>lacUV5</i> | GAC | GGC TTTAC ACTTTATGCTTCCGGCTCG TATAAT GTGTG GAC ATTGTGAG |
| NP58 | <i>lacUV5</i> | TAG | GGC TTTAC ACTTTATGCTTCCGGCTCG TATAAT GTGTG TAG ATTGTGAG |
| NP63 | <i>lacUV5</i> | CAC | GGC TTTAC ACTTTATGCTTCCGGCTCG TATAAT GTGTG CAC ATTGTGAG |
| NP2 | RNA1 | GAC | TTCT TTGAAG TGGTGGCCTAACTACGGCT TACACT AGAAG GAC AGTATTTG |
| NP45 | RNA1 | GAG | TTCT TTGAAG TGGTGGCCTAACTACGGCT TACACT AGAAG GAG AGTATTTG |
| NP70 | RNA1 | CAC | TTCT TTGAAG TGGTGGCCTAACTACGGCT TACACT AGAAG CAC AGTATTTG |
| DP1 | RNA1 | GAA | TTCT TTGAAG TGGTGGCCTAACTACGGCT TACACT AGAAG GAA AGTATTTG |
| DP2 | RNA1 | TAG | TTCT TTGAAG TGGTGGCCTAACTACGGCT TACACT AGAAG TAG AGTATTTG |
| NP1 | <i>Pveg</i> | TAG | TAT TTGACA AAAAATGGGCTCGTGTG TACAAT AAATG TAG TGAGGTGG |
| DP3 | <i>Pveg</i> | GAC | TAT TTGACA AAAAATGGGCTCGTGTG TACAAT AAATG GAC TGAGGTGG |
| DP4 | <i>Pveg</i> | GAG | TAT TTGACA AAAAATGGGCTCGTGTG TACAAT AAATG GAG TGAGGTGG |
| DP5 | <i>Pveg</i> | CAC | TAT TTGACA AAAAATGGGCTCGTGTG TACAAT AAATG CAC TGAGGTGG |
| DP6 | <i>Pveg</i> | GAA | TAT TTGACA AAAAATGGGCTCGTGTG TACAAT AAATG GAA TGAGGTGG |
| DP7 | <i>rrnB P1</i> | CAC | AAATTTCCCTC TTGTCA GGCCGGAATAACTCCCT TATAAT GCGCCAC CAC TGACACGG |
| DP8 | <i>rrnB P1</i> | TAG | AAATTTCCCTC TTGTCA GGCCGGAATAACTCCCT TATAAT GCGCCAC TAG TGACACGG |
| DP9 | <i>rrnB P1</i> | GAC | AAATTTCCCTC TTGTCA GGCCGGAATAACTCCCT TATAAT GCGCCAC GAC TGACACGG |
| DP10 | <i>rrnB P1</i> | GAA | AAATTTCCCTC TTGTCA GGCCGGAATAACTCCCT TATAAT GCGCCAC GAA TGACACGG |
| DP11 | <i>rrnB P1</i> | GAG | AAATTTCCCTC TTGTCA GGCCGGAATAACTCCCT TATAAT GCGCCAC GAG TGACACGG |

Podobně jako v předchozích fázích byla nejprve provedena transkripce *in vitro* s radioaktivně značeným UTP, aby byla určena síla jednotlivých promotorů. Výsledky těchto experimentů jsou ukázané na následujícím obrázku (obr. 28).



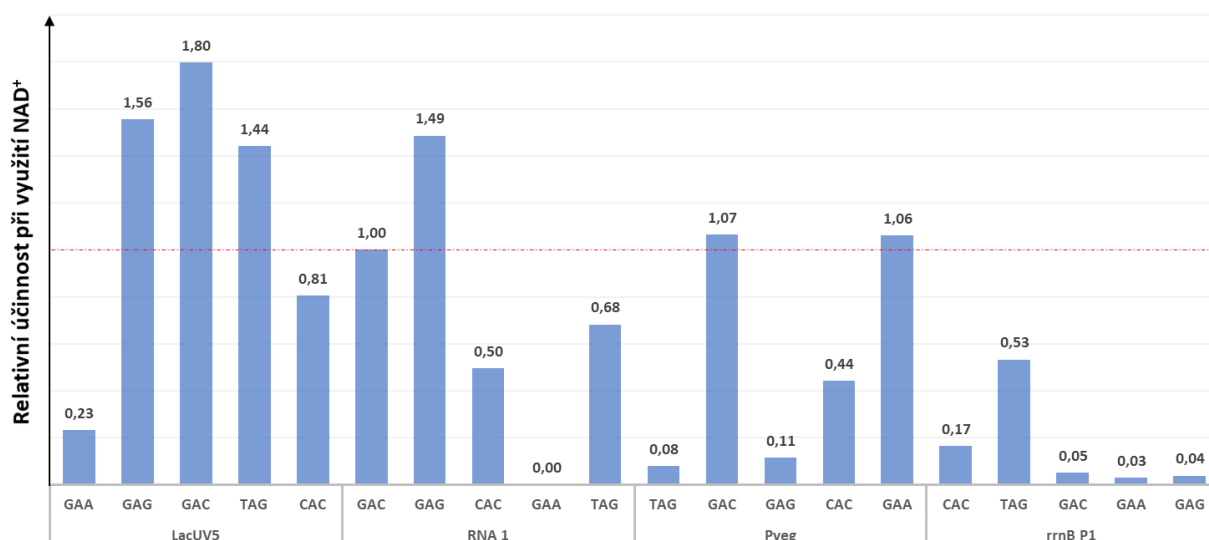
Obr. 28: 7% PAA gel se vzorky z transkripce *in vitro* s radioaktivně značeným UTP. Proužky „TEST RNA“ znázorňují transkript z daného testovaného promotoru, proužky „RNA1“ znázorňují transkript z endogenního promotoru pro RNA1. Graf nad gelem ukazuje hodnotu „TEST RNA“ vydělenou hodnotou „RNA1“, což je relativní síla daného promotoru vztažená k síle promotoru RNA1 (jedná se o výslednou sílu promotoru vypočítanou z několika transkripcí, ne pouze z uvedeného gelu).

Po určení síly jednotlivých promotorů z výsledků transkripce s radioaktivně značeným UTP byla obdobným způsobem provedena transkripce s radioaktivně značeným NAD^+ . Výsledky transkripce se značeným NAD^+ jsou ukázané na následujícím obrázku (Obr. 29).



Obr. 29: 7% PAA gel se vzorky z transkripce *in vitro* s radioaktivně značeným NAD^+ . Proužky „TEST RNA“ znázorňují transkript s NAD^+ na 5' konci z daného testovaného promotoru, proužky „RNA1“ znázorňují transkript s NAD^+ na 5' konci z endogenního promotoru pro RNA1. Graf nad gelem ukazuje hodnotu „TEST RNA“ vydělenou hodnotou „RNA1“ – výsledná hodnota ukazuje kolikrát více či méně má testovaná RNA na svém 5' konci NAD^+ oproti RNA1 (jedná se o zprůměrovanou hodnotu z několika gelů, nikoliv pouze z gelu na obrázku).

Po vyhodnocení výsledků z obou transkripcí byla vypočítána relativní účinnost jednotlivých promotorů při využití NAD^+ jako substrátu pro iniciaci transkripce (obr. 30).

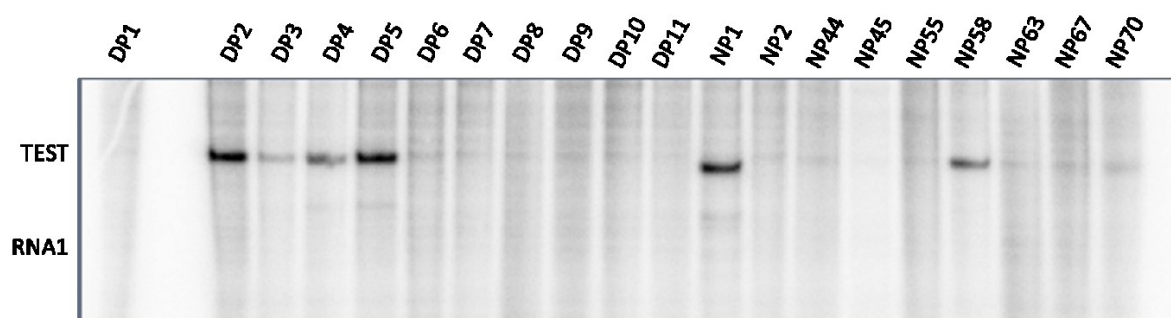


Obr. 30: Relativní účinnost jednotlivých promotorů při výběru NAD^+ jako substrátu pro iniciaci transkripce. Hodnota u každého sloupce ukazuje kolikrát je daný promotor účinnější (méně účinný) při výběru NAD^+ jako substrátu pro iniciaci transkripce než RNA1.

Výsledky 3. fáze transkripčních experimentů ukázaly, že sekvence promotoru mimo nukleotidů na pozicích -1 a +2 nejenže také ovlivňuje výběr substrátu pro iniciaci transkripce, ale také je na ni závislý význam nukleotidů -1 a +2 (více v kapitole Diskuze).

5.3.4 Transkripce *in vitro* s polymerázou z *B. subtilis*

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit rozdíl při výběru iniciačního substrátu pro transkripci mezi RNA polymerázami z *B. subtilis* a z *E. coli*. Polymeráza z *B. subtilis* má však rozdílné požadavky pro promotorovou sekvenci, než polymeráza z *E. coli* (Hawley a McClure 1983; Helmann 1995). Z tohoto důvodu RNAP z *B. subtilis* nerozpoznala některé používané sekvence jako promotor (obr. 31). Nejzásadnější bylo nerozpoznání promotoru RNA1. Ten je používán pro normalizaci účinnosti všech ostatních promotorů, takže nebylo možné polymerázy *B. subtilis* a *E. coli* z hlediska účinnosti výběru NAD⁺ jako iniciačního substrátu porovnat.



Obr. 31: 7% PAA gel z transkripce s polymerázou z *B. subtilis* a UTP*. Na místě, kde by se dal očekávat proužek transkriptu RNA1, žádný proužek není, protože RNAP z *B. subtilis* obtížně rozpoznává sekvenci RNA1 promotoru. Většina „TEST“ promotorů také nebyla polymerázou rozpoznána. Transkript lze pozorovat především u promotorů vycházejících z promotoru Pveg (DP2; DP3; DP4; DP5 a NP1), který je hlavním housekeeping promotorem v *B. subtilis* (Jarmer et al., 2001).

6. Diskuze

6.1 Příprava templátů pro transkripci

Bylo připraveno přes 70 templátů (plazmidů) pro transkripční experimenty *in vitro*. Všechny měly odpovídající čistotu ($1,8 \leq A_{260/280} \leq 2$; optické ověření čistoty na gelu) a koncentraci většinou mezi 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. V případě příliš nízké koncentrace izolovaného plazmidu, která mohla být způsobena velkými ztrátami při fenol-chloroformové extrakci, byla z glycerinové konzervy nechána narůst kultura daného kmenu a izolace byla opakována. Pokud byla absorbance $A_{260/280}$ menší, než 1,8 (mohlo by se jednat o kontaminaci proteiny), byl plazmid přesrážen a čistota opět zkontrolována. V případě neúspěchu byl plazmid izolován znovu. Absorbance $A_{260/280}$ nebyla nikdy větší než 2,0 (to by ukazovalo na příliš vysoký podíl RNA, Li et al., 2014). Část z izolovaných plazmidů byla zředěna na pracovní koncentraci 100 ng/ μl pro transkripční experimenty. Všechny plazmidy jsou uchovávány v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a je možné je použít, případně znovu izolovat z odpovídajících kmenů v glycerinových konzervách, kde mohou bakterie přežít po dlouhou dobu i po několika rozmraženích (Hollander a Nell 1954).

6.2 Enzym NudC

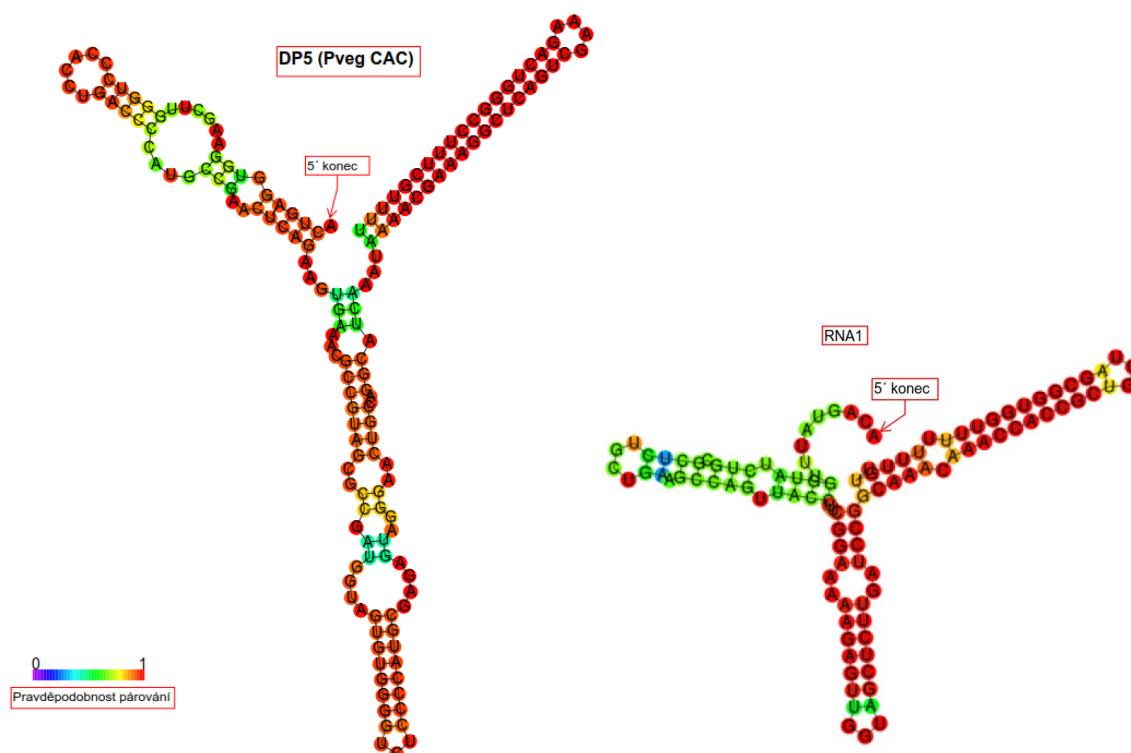
Izolaci NudC, enzymu odstraňujícího nikotinamidovou čepičku z 5' konce RNA, provázela řada problémů. Z [obrázku 19](#) se zdá, že se veškerý exprimovaný protein NudC srazil (vytvořil inkluzní tělíska), což může být způsobeno vysokou teplotou nebo příliš vysokou koncentrací proteinu (Tsumoto et al., 2010), a nebude tedy možné ho izolovat. Byly upravovány různé parametry, jako je doba a teplota indukce, nebo koncentrace IPTG použitého pro indukci, avšak výsledek byl vždy podobný. Nakonec jsem se rozhodl pro izolaci (podle Winz et al., 2017) i přesto, že bylo proteinu rozpuštěného v supernatantu na SDS-PAGE gelu téměř nedetekovatelné množství. Protein se i přesto povedlo izolovat v poměrně velkém množství – asi 2 ml proteinu o koncentraci 57 $\mu\text{mol/l}$, což je množství více než dostačující. V případě příliš nízké koncentrace izolovaného proteinu by bylo možné pokusit se přidat některé malé molekuly, jako jsou různé deriváty argininu, které brání tvorbě inkluzních tělísek (Yamaguchi a Miyazaki 2014).

Jak již bylo zmíněno v kapitole 5.2.2, izolaci enzymu NudC bylo nutno optimalizovat (pro první, neúspěšnou izolaci nejsou uvedeny výsledky). Poprvé se sice podařilo izolovat množství proteinu o něco větší než při druhé, úspěšné izolaci, protein však nevykazoval žádnou

enzymatickou aktivitu. To mohlo být způsobeno použitým pufrům – pro izolaci neaktivního proteinu byl použit stejný fosfátový pufr jako pro izolaci RNA polymerázy z *B. subtilis*, zatímco při druhé izolaci proteinu, kdy NudC enzymatickou aktivitu vykazovalo, byl použit Tris pufr podle (Winz et al., 2017). Zásadním rozdílem mezi oběma pufrů, který by mohl mít vliv na aktivitu NudC, je přítomnost hořčnatých iontů v Tris pufru, které jsou vyžadovány ke správné funkci enzymů z rodiny Nudix hydroláz, z níž NudC je (Frick a Bessman 1995).

Kvůli kontaminaci (patrná z [obr. 19](#)) neznámým proteinem byla část enzymu NudC přečištěna gelovou chromatografií. Jak je však vidět z [obrázku 20](#), kontaminující protein se touto metodou odstranit nepodařilo. Způsobeno to je s největší pravděpodobností tím, že gelová chromatografie rozděluje molekuly na základě jejich velikosti (Duong-Ly a Gabelli 2014) a tento neznámý protein je velikostně velice blízko dimeru NudC. V případě proužku o velikosti 60 kDa v druhé frakci ([obr. 19](#)) by se mohlo jednat o dimer NudC (velikostně souhlasí, Frick a Bessman 1995). Protein NudC obsahuje 6 cysteinů, které mohou tvořit můstky, a proteinu bylo ve vzorku velké množství. Z tohoto důvodu se domnívám, že by NudC mohl zčásti formovat dimer i v denaturačních podmínkách SDS-PAGE. Kontaminace enzymu nepřesáhla 5 % (odhadnuto vizuálně), proto jsem se rozhodl touto kontaminací dále nezabývat.

Zkouška aktivity prokázala, že NudC dokáže štěpit NAD^+ na NMN a AMP. NudC však nebylo schopné z větší části rozštěpit TEST RNA DP5 (snížení intenzity proužku na gelu asi o 20 %, [obr. 22](#)). To je pravděpodobně způsobené sekundární strukturou transkriptu ([obr. 32](#)), což je konzistentní s poznatkami z literatury, že NudC potřebuje jednovláknovou RNA, aby bylo schopné efektivně štěpit NAD^+ na jejím konci (Höfer et al., 2016). V případě RNA1 (sekundární struktura na [obr. 32](#)) byl NMN z 5' konce odstraněn, jen v případě RNázy J1 lze stále pozorovat přítomný proužek. Na základě toho, že NudC fungovalo v obou dalších případech s enzymy rSAP a Xrn1 a toho, že NudC ve vzorku rozštěpilo volné NAD^+ , se domnívám, že je problém způsoben nefunkční RNázou J1. Z pokusu se také zdá, že NudC štěpí volné NAD^+ lépe, než NAD^+ na konci RNA (zcela rozštěpené volné NAD^+ oproti NAD-RNA rozštěpené z 85 %), což je v rozporu s předešlými poznatkami (Höfer et al., 2016). Nelze však jednoznačně určit, jestli tato nižší účinnost odstranění NAD^+ z RNA je způsobena enzymem NudC, nebo enzymem odstraňujícím radioaktivní fosfát z 5' konce.



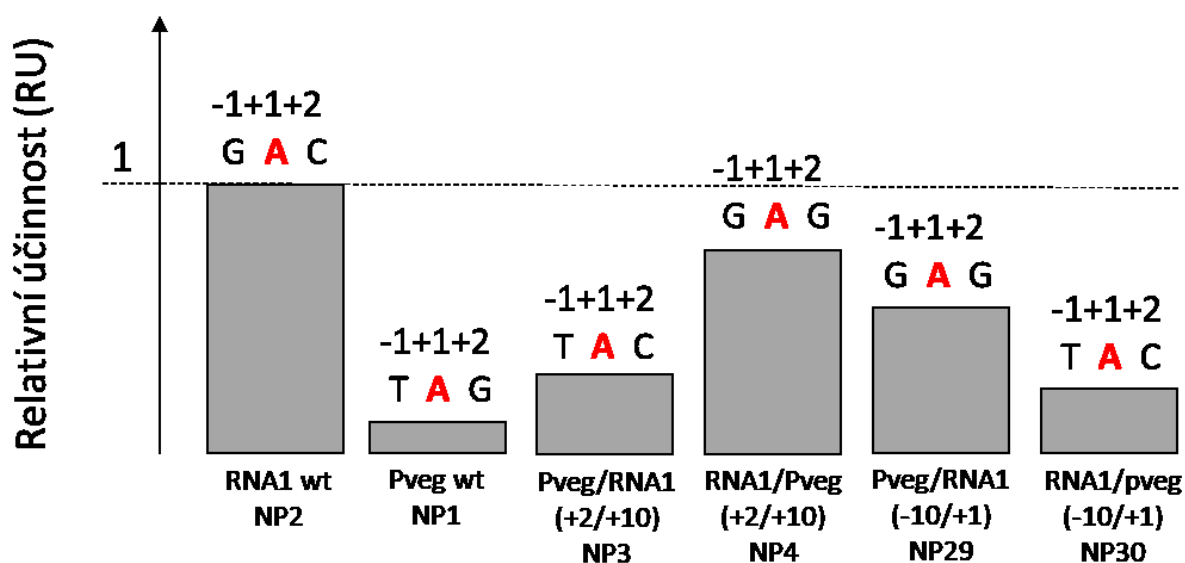
Obr. 32: Struktura transkriptu z promotoru DP5 (vlevo) a RNA1 (vpravo). Transkript DP5 na rozdíl od RNA1 nemá volný jednovláknový 5' konec, proto může být pro některé enzymy, jako je NudC, hůře dostupný. Obrázek byl získán pomocí RNAfold web serveru <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>.

6.3 Transkripční experimenty

6.3.1 1. fáze transkripčních experimentů

V první fázi transkripčních experimentů, prováděných převážně doktorkou Panovou, se podařilo zjistit, že výběr NAD^+ jako substrátu pro iniciaci transkripce je skutečně do značné míry ovlivněn sekvencí promotoru.

Značně rozdílné výsledky výběru NAD^+ však vykazovaly i chimérické promotory, které měly oproti divokému typu promotoru rozdílnou sekvenci na pozicích +2 až +10, případně -1 až -10 (obr. 33). Tyto výsledky odpovídaly modelu *in silico* (obr. 35), vytvořenému doktorem Barvíkem, podle kterého je pro využití NAD^+ jako substrátu pro iniciaci transkripce výhodná přítomnost guaninu na pozici -1. Výsledky z 1. fáze transkripčních experimentů a model *in silico* vedly doktorku Panovou k hypotéze, že by výběr NAD^+ jako iniciačního substrátu mohl být závislý na nejbližším okolí iniciačního nukleotidu, tedy na nukleotidech na pozicích -1 a +2.



Obr. 33: Relativní účinnost inkorporace NAD^+ promotorů RNA1, Pveg a jejich chimér: promotorů NP3, NP4, NP29 a NP30 (celé sekvence viz [tabulka č. 2](#)). Nad jednotlivými sloupci jsou znázorněny nukleotidy na pozicích -1 až +2 daného promotoru. Data získána a obrázek vytvořen ve spolupráci s doktorkou Natálií Panovou, nepublikovaná data.

6.3.2 2. fáze transkripčních experimentů

Druhá fáze transkripčních experimentů měla za cíl určit vliv jednotlivých nukleotidů na pozicích -1 a +2 na výběr substrátu pro iniciaci transkripce. Tento vliv byl zkoumán na promotoru *lacUV5* se všemi možnými kombinacemi nukleotidů na pozicích -1 a +2. Některé promotory bohužel neposkytly žádný transkript, což může být zapříčiněno třemi adeniny na začátku transkriptu, které by mohly způsobovat abortivní transkripci a znemožnit RNA polymeráze odpoutat se z promotoru.

Z výsledků se zdá ([obr. 34](#)), že RNA polymeráza využívá NAD^+ jako iniciační substrát častěji v případě, že je na pozici -1 guanin nebo adenin, což jsou purinové báze. Naopak v případě pyrimidinovýchází je frekvence výběru NAD^+ jako iniciačního substrátu pro transkripci nižší. To může být způsobeno sterickými zábranami mezi purinovou bází na templátovém vlákně (ta je větší než pyrimidinová) s nikotinamidovou částí NAD^+ . Na pozici +2 jsou preferovány guanin a cytosin oproti adeninu s thyminem, nicméně vždy hraje roli i báze na pozici -1.

| $\begin{smallmatrix} +2 \\ -1 \end{smallmatrix}$ | G | A | T | C |
|--|------|------|------|------|
| G | 1,56 | 0,23 | | 1,8 |
| A | 1,4 | | | 1,86 |
| T | 1,44 | | 0,45 | 1,16 |
| C | 0,85 | | 0,38 | 0,81 |

RU>1,5

RU<1,5

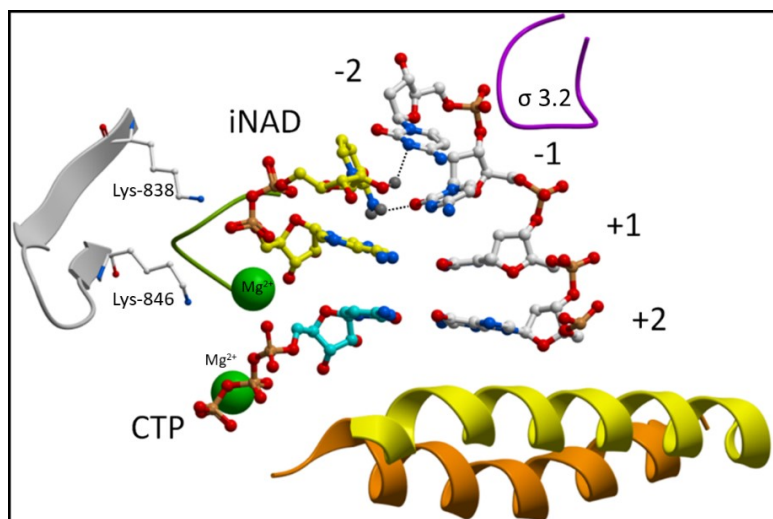
RU<1

RU<0,5

Obr. 34: Graficky znázorněné výsledky 2. fáze transkripčních experimentů. Tabulka znázorňuje relativní účinnost jednotlivých kombinací nukleotidů na pozicích -1 a +2 promotoru *lacUV5* při výběru NAD^+ jako iniciačního substrátu. Černě jsou vybarveny nefunkční kombinace.

Výsledky těchto pokusů mají podobný trend jako výsledky ze současné práce (Vvedenskaya et al., 2018), kde se autoři taktéž věnovali účinnosti promotoru *lacUV5* při využití NAD^+ jako substrátu pro iniciaci transkripce a tomu, jak různé sekvence v oblasti okolo iniciačního nukleotidu ovlivňují tuto účinnost. Způsob provedení a vyhodnocení experimentů byl však v tomto článku rozdílný, takže nelze výsledky zcela přesně porovnat.

Výsledky taktéž odpovídají predikci modelu *in silico* (obr. 35), vypracovaného doktorem Barvíkem, který předpovídal výhodnou interakci mezi iniciačním NAD^+ a cytosinu na pozici -1 templátového vlákna (tedy guanosin na -1 pozici promotoru).

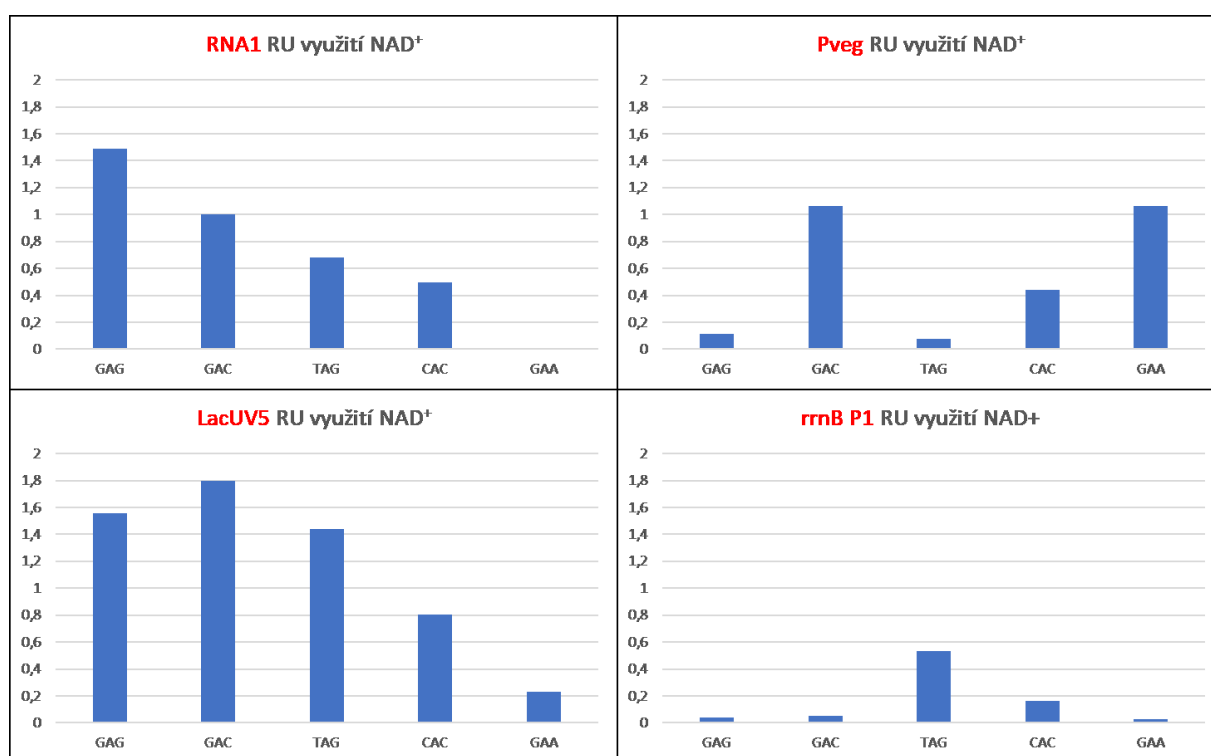


Obr. 35: Model *in silico* interakce iniciačního NAD^+ s thyminem na pozici +1 a cytosinem na pozici -1 templátového vlákna. Dále je na obrázku vyznačena část domény 3 podjednotky σ (která interaguje s templátovým vláknem), alfa helixy a Lysiny (838 a 846) reakčního centra RNA polymerázy a hořečnaté kationty (zelené koule). Obrázek převzat a upraven od doktora Barvíka, nepublikovaná data.

6.3.3 3. fáze transkripčních experimentů

Ve třetí fázi transkripčních experimentů jsem se pokoušel zjistit, zdali je vliv nukleotidů na pozicích -1 a +2 na výběr substrátu pro iniciaci transkripce stejný pro různé promotory a jakou roli při tom celém hraje zbytek promotoru.

Výsledky jednoznačně ukazují, že nukleotidy na pozici 1 a +2 hrají při výběru NAD^+ jako substrátu pro iniciaci transkripce zásadní roli (obr. 36). Nicméně to, jak tyto nukleotidy ovlivňují výběr iniciačního substrátu je nejspíše do značné míry určeno právě typem promotoru. Vidíme vedle sebe promotory *lacUV5* a *RNA1* s podobnými výsledky využití NAD^+ (oba promotory jsou za standardních podmínek exprimovány faktorem σ^{70} v *E. coli*) a naprosto rozdílné výsledky využití NAD^+ u promotorů *Pveg* (konstitutivní promotor exprimovaný faktorem σ^A v *B. subtilis*) a *rrnB P1* (promotor iniciující expresi operonu pro rRNA v *E. coli*).



Obr. 36: Porovnání jednotlivých promotorů z hlediska relativní účinnosti výběru NAD^+ jako substrátu pro iniciaci transkripce. Jedná se vždy o pět kombinací (GAG, GAC, TAG, CAC, GAA) nukleotidů na pozicích -1 až +2 u promotorů *RNA1*, *Pveg*, *lacUV5* a *rrnB P1*. Nulová efektivita inkorporace NAD^+ v případě promotoru *RNA1* GAA je způsobena celkovou nefunkčností tohoto promotoru.

Důvodem rozdílných výsledků mezi promotory by kromě nukleotidů -1 a +2 také mohly být další nukleotidy v okolí transkripčního počátku. V recentním článku (Vvedenskaya et al., 2018) je ukázáno, že vliv na výběr substrátu pro iniciaci transkripce mají nukleotidy na pozicích -3 až +4. Tento článek bohužel vyšel až po provedení mých transkripčních experimentů, proto jsem při návrhu těchto experimentů s jeho výsledky nepočítal, a porovnávané promotory mají na pozicích -3, -2, +3 a +4 rozdílné nukleotidy (v rámci jednoho promotoru jsou nukleotidy na těchto pozicích stejné).

Nefunkčnost promotoru DP1 (RNA1 GAA) je velice pravděpodobně způsobena třemi adeniny v řadě za sebou na začátku transkriptu. Párování bází A a T je slabší, než párování G a C. Z tohoto důvodu může docházet k abortivní iniciaci transkripce a RNA polymeráze není umožněno opustit promotorovou oblast (Heyduk a Heyduk 2018).

6.3.4 Budoucí experimenty

S odkazem na výsledky 3. fáze transkripčních experimentů a zmíněný článek (Vvedenskaya et al., 2018) jsem navrhnul další sadu promotorů (tabulka č. 4). Tyto promotory (RNA1, Pveg, *lacUV5* a *rrnB* P1) mají shodnou sekvenci od pozice -4 dál (downstream), a měly by s konečnou platností prokázat (případně vyvrátit), že sekvence promotoru od pozice -5 výše (upstream) skutečně má vliv na výběr substrátu pro iniciaci transkripce.

Tabulka č. 4: Návrh sekvence promotorů pro další experimenty

| Promotor | -4 až +10 | Sekvence |
|---------------------------------------|----------------|---|
| <i>lacUV5</i> | <i>lacUV5</i> | GGC TTTACAC CTTTATGCTTCCGGCTCG TATAAT GTGTGG A ATTGTGAGC |
| RNA1 | <i>lacUV5</i> | TTCTTGAAG TGGTGGCCTAACTACGGC TACACTAG GTGG A ATTGTGAGC |
| Pveg | <i>lacUV5</i> | TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTACAATAA GTGG A ATTGTGAGC |
| <i>rrnB</i> P1 (<i>E. coli</i>) | <i>lacUV5</i> | AAATGCT TTGTC AGGCCGGAATAACTCC TATAAT GCGCGTGG A ATTGTGAGC |
| <i>rrnB</i> P1 (<i>B. subtilis</i>) | <i>lacUV5</i> | AAACTA TTGCAA TAAATAAATACAGGTGT TATATT ATTGTGG A ATTGTGAGC |
| <i>lacUV5</i> | RNA1 | GGC TTTACAC CTTTATGCTTCCGGCTCG TATAAT GT AAGGACAGTATTTG |
| RNA1 | RNA1 | TTCTTGAAG TGGTGGCCTAACTACGGC TACACTAG AAGG ACAGTATTTG |
| Pveg | RNA1 | TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTACAATAA AAGG ACAGTATTTG |
| <i>rrnB</i> P1 (<i>E. coli</i>) | RNA1 | AAATGCT TTGTC AGGCCGGAATAACTCC TATAAT GCGC AAGGACAGTATTTG |
| <i>rrnB</i> P1 (<i>B. subtilis</i>) | RNA1 | AAACTA TTGCAA TAAATAAATACAGGTGT TATATT ATT AAGGACAGTATTTG |
| <i>lacUV5</i> | Pveg | GGC TTTACAC CTTTATGCTTCCGGCTCG TATAAT GT ATGTAGTGAGGTGG |
| RNA1 | Pveg | TTCTTGAAG TGGTGGCCTAACTACGGC TACACTAG ATGT AGTGAGGTGG |
| Pveg | Pveg | TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTACAATAA ATGT AGTGAGGTGG |
| <i>rrnB</i> P1 (<i>E. coli</i>) | Pveg | AAATGCT TTGTC AGGCCGGAATAACTCC TATAAT GCGC ATGTAGTGAGGTGG |
| <i>rrnB</i> P1 (<i>B. subtilis</i>) | Pveg | AAACTA TTGCAA TAAATAAATACAGGTGT TATATT ATT ATGTAGTGAGGTGG |
| <i>lacUV5</i> | <i>rrnB</i> P1 | GGC TTTACAC CTTTATGCTTCCGGCTCG TATAAT GT CACCACCGCGC |
| RNA1 | <i>rrnB</i> P1 | TTCTTGAAG TGGTGGCCTAACTACGGC TACACTAG CACC ACCGCGC |
| Pveg | <i>rrnB</i> P1 | TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTACAATAA CACC ACCGCGC |
| <i>rrnB</i> P1 (<i>E. coli</i>) | <i>rrnB</i> P1 | AAATGCT TTGTC AGGCCGGAATAACTCC TATAAT GCGCCACC ACCGCGC |
| <i>rrnB</i> P1 (<i>B. subtilis</i>) | <i>rrnB</i> P1 | AAACTA TTGCAA TAAATAAATACAGGTGT TATATT ATTCACC ACCGCGC |

6.3.5 Transkripce s polymerázou *B. subtilis*

Protože polymeráza z *B. subtilis* nebyla schopná rozpoznat většinu používaných promotorů při transkripci s radioaktivně značeným UTP, transkripci s radioaktivně značeným NAD⁺ jsem se rozhodl neprovádět. Nerozpoznání promotorových oblastí bylo zřejmě způsobeno rozdílnými sekvenčními požadavky polymerázy z *B. subtilis* oproti *E. coli* (Sojka et al., 2011). Většina polymerázou z *B. subtilis* rozpoznávaných promotorů byla odvozena od promotoru *Pveg*, což je vegetativní promotor v *B. subtilis*, běžně touto polymerázou rozpoznáván (Jarmer et al., 2001). Pro porovnání polymeráz *E. coli* a *B. subtilis* by bylo třeba nejen jiné sady promotorů, které by byly rozpoznávány oběma polymerázami, ale i jiného plazmidu s endogenní promotorovou sekvencí, která by mohla sloužit podobně jako RNA1 v předešlých experimentech. Z toho důvodu jsem se rozhodl v dalších pokusech s RNAP z *B. subtilis* dále nepokračovat.

7. Souhrn

Bylo vytvořeno přes 70 bakteriálních kmenů nesoucích plazmid p770 s různými inzerty sloužícími jako promotorové sekvence. Tyto plazmidy byly izolovány a využity jako templáty při transkripčních pokusech *in vitro*.

Byla izolována RNA polymeráza z *B. subtilis* a protein NudC, enzym štěpící NAD^+ na NMN a AMP, který bude následně použit v naší laboratoři na pokusy *in vivo* s NAD^+ čepičkou. Byla ověřena aktivita tohoto enzymu.

Z transkripčních pokusů *in vitro* s polymerázou *E. coli* bylo vyvozeno několik závěrů:

- Sekvence promotoru má vliv na výběr substrátu pro iniciaci transkripce.
- Nukleotidy na pozicích -1 a +2 hrají důležitou roli při výběru substrátu pro iniciaci transkripce.
- Sekvence promotoru do jisté míry určuje význam nukleotidů na pozicích -1 a +2 při výběru substrátu pro iniciaci transkripce.

Byl proveden pokus o porovnání RNA polymerázy z *E. coli* a *B. subtilis* z hlediska účinnosti výběru NAD^+ jako substrátu pro iniciaci transkripce. Kvůli nerozpoznání některých promotorových sekvencí polymerázou *B. subtilis* však nemohlo být toto porovnání provedeno.

Tato práce podporuje dnes již víceméně obecně uznávanou kotranskripční hypotézu o zabudování NAD^+ do RNA oproti hypotéze posttranskripční.

8. Seznam použité literatury

Aoyama, T., M. Takanami, E. Ohtsuka, Y. Taniyama, R. Marumoto, H. Sato and M. Ikehara (1983). "Essential structure of *E. coli* promoter effect of spacer length between the two consensus sequences on promoter function." Nucleic acids research **11**(17): 5855-5864.

Bae, B., A. Feklistov, A. Lass-Napiorkowska, R. Landick and S. A. Darst (2015). "Structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme open promoter complex." Elife **4**: e08504.

Barne, K. A., J. A. Bown, S. J. Busby and S. D. Minchin (1997). "Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ 70 subunit is responsible for the recognition of the 'extended- 10' motif at promoters." The EMBO journal **16**(13): 4034-4040.

Barvík, I., D. Rejman, N. Panova, H. Šanderová and L. Krásný (2017). "Non-canonical transcription initiation: the expanding universe of transcription initiating substrates." FEMS microbiology reviews **41**(2): 131-138.

Basu, R. S., B. A. Warner, V. Molodtsov, D. Pupov, D. Esyunina, C. Fernández-Tornero, A. Kulbachinskiy and K. S. Murakami (2014). "Structural basis of transcription initiation by bacterial RNA polymerase holoenzyme." Journal of Biological Chemistry: jbc. M114. 584037.

Bird, J. G., Y. Zhang, Y. Tian, N. Panova, I. Barvík, L. Greene, M. Liu, B. Buckley, L. Krásný and J. K. Lee (2016). "The mechanism of RNA 5' capping with NAD⁺, NADH and desphospho-CoA." Nature **535**: 444-447

Buck, M., M.-T. Gallegos, D. J. Studholme, Y. Guo and J. D. Gralla (2000). "The bacterial enhancer-dependent ζ 54 (ζ N) transcription factor." Journal of bacteriology **182**(15): 4129-4136.

Burgess, R. R. (1969). "Separation and characterization of the subunits of ribonucleic acid polymerase." Journal of Biological Chemistry **244**(22): 6168-6176.

Cahová, H., M.-L. Winz, K. Höfer, G. Nübel and A. Jäschke (2015). "NAD captureSeq indicates NAD as a bacterial cap for a subset of regulatory RNAs." Nature **519**: 374-377

Carpousis, A. J. and J. D. Gralla (1980). "Cycling of ribonucleic acid polymerase to produce oligonucleotides during initiation in vitro at the *lac* UV5 promoter." Biochemistry **19**(14): 3245-3253.

Duong-Ly, K. C. and S. B. Gabelli (2014). Gel filtration chromatography (size exclusion chromatography) of proteins. Methods in enzymology, Elsevier. **541**: 105-114.

Estrem, S. T., T. Gaal, W. Ross and R. L. Gourse (1998). "Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(17): 9761-9766.

Estrem, S. T., W. Ross, T. Gaal, Z. S. Chen, W. Niu, R. H. Ebricht and R. L. Gourse (1999). "Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase α subunit." Genes & development **13**(16): 2134-2147.

Feklistov, A., B. D. Sharon, S. A. Darst and C. A. Gross (2014). "Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective." Annual review of microbiology **68**: 357-376.

Finn, R. D., E. V. Orlova, B. Gowen, M. Buck and M. van Heel (2000). "*Escherichia coli* RNA polymerase core and holoenzyme structures." The EMBO journal **19**(24): 6833-6844.

Frick, D. N. and M. J. Bessman (1995). "Cloning, purification, and properties of a novel NADH pyrophosphatase evidence for a nucleotide pyrophosphatase catalytic domain in MutT-like enzymes." Journal of Biological Chemistry **270**(4): 1529-1534.

Gaal, T., M. S. Bartlett, W. Ross, C. L. Turnbough and R. L. Gourse (1997). "Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria." Science **278**(5346): 2092-2097.

Gentry, D., H. Xiao, R. Burgess and M. Cashel (1991). "The omega subunit of *Escherichia coli* K-12 RNA polymerase is not required for stringent RNA control *in vivo*." Journal of bacteriology **173**(12): 3901-3903.

Gentry, D. R. and R. R. Burgess (1993). "Cross-linking of *Escherichia coli* RNA polymerase subunits: Identification of beta' as the binding site of omega." Biochemistry **32**(41): 11224-11227.

Ghosh, P., A. Ishihama and D. Chatterji (2001). "*Escherichia coli* RNA polymerase subunit ω and its N-terminal domain bind full-length β' to facilitate incorporation into the $\alpha 2\beta$ subassembly." European Journal of Biochemistry **268**(17): 4621-4627.

Goldman, S. R., J. S. Sharp, I. O. Vvedenskaya, J. Livny, S. L. Dove and B. E. Nickels (2011). "NanoRNAs prime transcription initiation *in vivo*." Molecular cell **42**(6): 817-825.

Grossman, A. D., J. W. Erickson and C. A. Gross (1984). "The *htpR* gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters." Cell **38**(2): 383-390.

Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Journal of molecular biology **166**(4): 557-580.

Haugen, S. P., M. B. Berkmen, W. Ross, T. Gaal, C. Ward and R. L. Gourse (2006). "rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of σ region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase." Cell **125**(6): 1069-1082.

Haugen, S. P., W. Ross, M. Manrique and R. L. Gourse (2008). "Fine structure of the promoter– σ region 1.2 interaction." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(9): 3292-3297.

Hawley, D. K. and W. R. McClure (1983). "Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences." Nucleic acids research **11**(8): 2237-2255.

Hayward, R. S., K. Igarashi and A. Ishihama (1991). "Functional specialization within the α -subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase." Journal of molecular biology **221**(1): 23-29.

Helmann, J. D. (1995). "Compilation and analysis of *Bacillus Subtilis* σ A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA." Nucleic acids research **23**(13): 2351-2360.

Henderson, K. L., L. C. Felth, C. M. Molzahn, I. Shkel, S. Wang, M. Chhabra, E. F. Ruff, L. Bieter, J. E. Kraft and M. T. Record (2017). "Mechanism of transcription initiation and promoter escape by *E. coli* RNA polymerase." Proceedings of the National Academy of Sciences **114**(15): E3032-E3040.

Heyduk, E. and T. Heyduk (2018). "DNA template sequence control of bacterial RNA polymerase escape from the promoter." Nucleic acids research **46**(9): 4469-4486.

Höfer, K., S. Li, F. Abele, J. Frindert, J. Schlotthauer, J. Grawenhoff, J. Du, D. J. Patel and A. Jäschke (2016). "Structure and function of the bacterial decapping enzyme NudC." Nature chemical biology **12**(9): 730.

Hollander, D. H. and E. E. Nell (1954). "Improved preservation of *Treponema pallidum* and other bacteria by freezing with glycerol." Applied microbiology **2**(3): 164.

Hurwitz, J. (2005). "The discovery of RNA polymerase." Journal of Biological Chemistry **280**(52): 42477-42485.

Chen, Y. G., W. E. Kowtoniuk, I. Agarwal, Y. Shen and D. R. Liu (2009). "LC/MS analysis of cellular RNA reveals NAD-linked RNA." Nature chemical biology **5**(12): 879-881.

Ingledeu, W. and R. Poole (1984). "The respiratory chains of *Escherichia coli*." Microbiological reviews **48**(3): 222.

Jarmer, H., T. S. Larsen, A. Krogh, H. H. Saxild, S. Brunak and S. Knudsen (2001). "Sigma A recognition sites in the *Bacillus subtilis* genome." Microbiology **147**(9): 2417-2424.

Jiao, X., S. K. Doamekpor, J. G. Bird, B. E. Nickels, L. Tong, R. P. Hart and M. Kiledjian (2017). "5' end nicotinamide adenine dinucleotide cap in human cells promotes RNA decay through DXO-mediated deNADding." Cell **168**(6): 1015-1027. e1010.

Julius, C., A. Riaz-Bradley and Y. Yuzenkova (2018). "RNA capping by mitochondrial and multi-subunit RNA polymerases." Transcription.

Julius, C. and Y. Yuzenkova (2017). "Bacterial RNA polymerase caps RNA with various cofactors and cell wall precursors." Nucleic acids research **45**(14): 8282-8290.

Keilty, S. and M. Rosenberg (1987). "Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity." Journal of Biological Chemistry **262**(13): 6389-6395.

Keller, A. N., X. Yang, J. Wiedermannová, O. Delumeau, L. Krásný and P. J. Lewis (2014). "ε, a new subunit of RNA polymerase found in Gram-positive bacteria." Journal of bacteriology **196**(20): 3622-3632.

Krásný, L. and R. L. Gourse (2004). "An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation." The EMBO journal **23**(22): 4473-4483.

Li, X., Y. Wu, L. Zhang, Y. Cao, Y. Li, J. Li, L. Zhu and G. Wu (2014). "Comparison of three common DNA concentration measurement methods." Analytical biochemistry **451**: 18-24.

Lin, S.-J. and L. Guarente (2003). "Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease." Current opinion in cell biology **15**(2): 241-246.

Liu, J. and C. Turnbough (1994). "Effects of transcriptional start site sequence and position on nucleotide-sensitive selection of alternative start sites at the *pyrC* promoter in *Escherichia coli*." Journal of bacteriology **176**(10): 2938-2945.

Luciano, D. J. and J. G. Belasco (2015). "NAD in RNA: unconventional headgear." Trends in biochemical sciences **40**(5): 245-247.

Mathy, N., L. Bénard, O. Pellegrini, R. Daou, T. Wen and C. Condon (2007). "5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA." Cell **129**(4): 681-692.

Mechold, U., G. Fang, S. Ngo, V. Ogryzko and A. Danchin (2007). "YtqI from *Bacillus subtilis* has both oligoribonuclease and pAp-phosphatase activity." Nucleic acids research **35**(13): 4552-4561.

Merrick, M. (1993). "In a class of its own—the RNA polymerase sigma factor σ ; 54 (σ N)." Molecular microbiology **10**(5): 903-909.

Mukherjee, K. and D. Chatterji (1997). "Studies on the ω Subunit of *Escherichia coli* RNA Polymerase: Its Role in the Recovery of Denatured Enzyme Activity." European Journal of Biochemistry **247**(3): 884-889.

Murakami, K. S. (2015). "Structural biology of bacterial RNA polymerase." Biomolecules **5**(2): 848-864.

Murakami, K. S., S. Masuda, E. A. Campbell, O. Muzzin and S. A. Darst (2002). "Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex." Science **296**(5571): 1285-1290.

Murray, H. D., D. A. Schneider and R. L. Gourse (2003). "Control of rRNA expression by small molecules is dynamic and nonredundant." Molecular cell **12**(1): 125-134.

Nickels, B. E. and S. L. Dove (2011). "NanoRNAs: a class of small RNAs that can prime transcription initiation in bacteria." Journal of molecular biology **412**(5): 772-781.

Niyogi, S. K. and A. Stevens (1964). "Studies on ribonucleic acid polymerase with synthetic polyribonucleotides as templates: effect of oligonucleotides on the reactions." Biochemical and biophysical research communications **16**(3): 272-277.

Nudler, E. (2009). "RNA polymerase active center: the molecular engine of transcription." Annual review of biochemistry **78**: 335-361.

Olsen, R. L., K. Øverbø and B. Myrnes (1991). "Alkaline phosphatase from the hepatopancreas of shrimp (*Pandalus borealis*): a dimeric enzyme with catalytically active subunits." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry **99**(4): 755-761.

Paget, M. S. (2015). "Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: structure, function and distribution." Biomolecules **5**(3): 1245-1265.

Panozzo, C., M. Nawara, C. Suski, R. Kucharczyka, M. Skoneczny, A.-M. Bécam, J. Rytka and C. J. Herbert (2002). "Aerobic and anaerobic NAD⁺ metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS letters **517**(1-3): 97-102.

Pero, J., J. Nelson and T. D. Fox (1975). "Highly asymmetric transcription by RNA polymerase containing phage-SP01-induced polypeptides and a new host protein." Proceedings of the National Academy of Sciences **72**(4): 1589-1593.

Popham, D. L., D. Szeto, J. Keener and S. Kustu (1989). "Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers." Science **243**(4891): 629-635.

Qi, Y. and F. M. Hulett (1998). "PhoP[~] P and RNA polymerase σ A holoenzyme are sufficient for transcription of Pho regulon promoters in *Bacillus subtilis*: PhoP[~] P activator sites within the coding region stimulate transcription *in vitro*." Molecular microbiology **28**(6): 1187-1197.

Rabatinová, A., H. Šanderová, J. J. Matějčková, J. Korelusová, L. Sojka, I. Barvík, V. Papoušková, V. Sklenář, L. Žídek and L. Krásný (2013). "The δ subunit of RNA polymerase is required for rapid changes in gene expression and competitive fitness of the cell." Journal of bacteriology **195**(11): 2603-2611.

Rao, L., W. Ross, J. A. Appleman, T. Gaal, S. Leirmo, P. J. Schlax, M. T. Record Jr and R. L. Gourse (1994). "Factor independent activation of *rrnB* P1: An "extended" promoter with an upstream element that dramatically increases promoter strength." Journal of molecular biology **235**(5): 1421-1435.

Revyakin, A., C. Liu, R. H. Ebright and T. R. Strick (2006). "Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching." Science **314**(5802): 1139-1143.

Rosenberg, M. and D. Court (1979). "Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription." Annual review of genetics **13**(1): 319-353.

Ross, W., K. K. Gosink, J. Salomon, K. Igarashi, C. Zou, A. Ishihama, K. Severinov and R. L. Gourse (1993). "A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase." Science **262**(5138): 1407-1413.

Ross, W., J. F. Thompson, J. T. Newlands and R. L. Gourse (1990). "*E. coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription in vitro and in vivo." The EMBO journal **9**(11): 3733-3742.

Ruff, E. F., A. C. Drennan, M. W. Capp, M. A. Poulos, I. Artsimovitch and M. T. Record Jr (2015). "*E. coli* RNA polymerase determinants of open complex lifetime and structure." Journal of molecular biology **427**(15): 2435-2450.

Ruff, E. F., M. T. Record and I. Artsimovitch (2015). "Initial events in bacterial transcription initiation." Biomolecules **5**(2): 1035-1062.

Shimada, T., Y. Yamazaki, K. Tanaka and A. Ishihama (2014). "The whole set of constitutive promoters recognized by RNA polymerase RpoD holoenzyme of *Escherichia coli*." PLoS One **9**(3): e90447.

Shimotohno, K., Y. Kodama, J. Hashimoto and K.-I. Miura (1977). "Importance of 5'-terminal blocking structure to stabilize mRNA in eukaryotic protein synthesis." Proceedings of the National Academy of Sciences **74**(7): 2734-2738.

Siebenlist, U., R. B. Simpson and W. Gilbert (1980). "*E. coli* RNA polymerase interacts homologously with two different promoters." Cell **20**(2): 269-281.

Sojka, L., T. Kouba, I. Barvík, H. Šanderová, Z. Maderová, J. Jonák and L. Krásný (2011). "Rapid changes in gene expression: DNA determinants of promoter regulation by the concentration of the transcription initiating NTP in *Bacillus subtilis*." Nucleic acids research **39**(11): 4598-4611.

Srouji, J. R., A. Xu, A. Park, J. F. Kirsch and S. E. Brenner (2017). "The evolution of function within the Nudix homology clan." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **85**(5): 775-811.

Stevens, A. (1980). "Purification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* exoribonuclease which yields 5'-mononucleotides by a 5' to 3' mode of hydrolysis." Journal of Biological Chemistry **255**(7): 3080-3085.

Tamm, J. and B. Polisky (1985). "Characterization of the ColE1 primer-RNA1 complex: analysis of a domain of ColE1 RNA1 necessary for its interaction with primer RNA." Proceedings of the National Academy of Sciences **82**(8): 2257-2261.

Tsumoto, K., R. Abe, D. Ejima and T. Arakawa (2010). "Non-denaturing solubilization of inclusion bodies." Current pharmaceutical biotechnology **11**(3): 309-312.

Vvedenskaya, I. O., J. G. Bird, Y. Zhang, Y. Zhang, X. Jiao, I. Barvík, L. Krásný, M. Kiledjian, D. M. Taylor and R. H. Ebright (2018). "CapZyme-Seq Comprehensively Defines Promoter-Sequence Determinants for RNA 5' Capping with NAD⁺." Molecular cell **70**(3): 553-564. e559.

Vvedenskaya, I. O., J. S. Sharp, S. R. Goldman, P. N. Kanabar, J. Livny, S. L. Dove and B. E. Nickels (2012). "Growth phase-dependent control of transcription start site selection and gene expression by nanoRNAs." Genes & development **26**(13): 1498-1507.

Vvedenskaya, I. O., Y. Zhang, S. R. Goldman, A. Valenti, V. Visone, D. M. Taylor, R. H. Ebright and B. E. Nickels (2015). "Massively systematic transcript end readout, "MASTER": Transcription start site selection, transcriptional slippage, and transcript yields." Molecular cell **60**(6): 953-965.

Walters, R. W., T. Matheny, L. S. Mizoue, B. S. Rao, D. Muhlrads and R. Parker (2017). "Identification of NAD⁺ capped mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*." Proceedings of the National Academy of Sciences **114**(3): 480-485.

Weiss, A. and L. N. Shaw (2015). "Small things considered: the small accessory subunits of RNA polymerase in Gram-positive bacteria." FEMS microbiology reviews **39**(4): 541-554.

Wilkinson, A., J. Day and R. Bowater (2001). "Bacterial DNA ligases." Molecular microbiology **40**(6): 1241-1248.

Winkelman, J. T., B. T. Winkelman, J. Boyce, M. F. Maloney, A. Y. Chen, W. Ross and R. L. Gourse (2015). "Crosslink mapping at amino acid-base resolution reveals the path of scrunched DNA in initial transcribing complexes." Molecular cell **59**(5): 768-780.

Winz, M.-L., H. Cahová, G. Nübel, J. Frindert, K. Höfer and A. Jäschke (2017). "Capture and sequencing of NAD-capped RNA sequences with NAD captureSeq." Nature protocols **12**(1): 122.

Yamaguchi, H. and M. Miyazaki (2014). "Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies." Biomolecules **4**(1): 235-251.

Yang, X. and P. J. Lewis (2008). "Overproduction and purification of recombinant *Bacillus subtilis* RNA polymerase." Protein expression and purification **59**(1): 86-93.

Zhang, G., E. A. Campbell, L. Minakhin, C. Richter, K. Severinov and S. A. Darst (1999). "Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution." Cell **98**(6): 811-824.

Zhang, N. and M. Buck (2015). "A perspective on the enhancer dependent bacterial RNA polymerase." Biomolecules **5**(2): 1012-1019.

Zuo, Y. and T. A. Steitz (2015). "Crystal structures of the *E. coli* transcription initiation complexes with a complete bubble." Molecular cell **58**(3): 534-540.